TANINO EM SORGO: MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO E ANÁLISE GENÉTICA

WALTER ALVARENGA RODRIGUES

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. GERALDO ANTONIO TOSELLO

**Tese apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz",
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Agronomia, Área de Concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas.**

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Agosto - 1996

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Rodrigues, Walter Alvarenga

Tanino em sorgo: métodos de determinação e análise genética / Walter Alvarenga Rodrigues. - - Piracicaba, 1996.

81p. : il.

Tese (doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1996.
Bibliografia.

1. Matéria seca - Digestibilidade 2. Sorgo - Melhoramento 3. Tanino em sorgo -
Teor - Análise quantitativa I. Título

CDD 633.174

TANINO EM SORGO: MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO E ANÁLISE GENÉTICA

WALTER ALVARENGA RODRIGUES

Aprovada em: 27.09.1996

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Geraldo Antonio Tosello	ESALQ/USP
Prof. Dr. Natal Antonio Vello	ESALQ/USP
Prof. Dr. Claudio Lopes de Souza Júnior	ESALQ/USP
Dr. Edilson Paiva	CNPMS/EMBRAPA
Dr. Paulo César Magalhães	CNPMS/EMBRAPA

Prof. Dr. GERALDO ANTONIO TOSELLO
Orientador

*À minha esposa Ana Amélia,
pelo amor, carinho, compreensão
e incentivo.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, pela oportunidade concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão de bolsas de estudos durante os períodos de 1992/94 (CNPq) e 1995/96 (CAPES).

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS/EMBRAPA) e ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), pelo apoio e facilidades proporcionadas na condução dos experimentos.

À Universidade Federal de Goiás (UFG) pela oportunidade de concluir o curso.

Ao Prof. Dr. Geraldo Antonio Tosello (Orientador) e ao Dr. Paulo César Magalhães (Co-Orientador) pela amizade, incentivo, confiança e consideração demonstrada.

Ao Dr. Fredolino Giacomini dos Santos (CNPMS/EMBRAPA) e ao Prof. Dr. Antônio Gilberto Bertechini (UFLA) pelo planejamento e orientação na condução dos experimentos.

Ao Dr. Antônio Carlos de Oliveira (CNPMS/EMBRAPA) pela realização das análises estatísticas.

Aos funcionários do CNPMS/EMBRAPA José Eduardo Filho e Miguel Reis pelo auxílio nas análises laboratoriais.

Ao Dr. Edilson Paiva pelas valiosas sugestões a este trabalho e contribuição à minha formação profissional.

Ao Professores Dr. Natal Antonio Vello (ESALQ/USP) e Dr. Claudio Lopes de Souza Júnior (ESALQ/USP) pelas sugestões a este trabalho e pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Luiz Antônio de Bastos Andrade (UFLA) pelo apoio, incentivo, amizade e consideração.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Enfim, a DEUS, por tudo.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. O Sorgo: Origem, distribuição e utilização....	5
2.2. Natureza química dos compostos fenólicos.....	6
2.3. Formação do complexo tanino-proteína.....	8
2.4. Benefícios agronômicos dos taninos.....	11
2.4.1. Resistência a pássaros.....	11
2.4.2. Resistência aos fungos causadores da podridão no grão antes da colheita.....	13
2.4.3. Redução na germinação de grãos na panícula.....	14
2.4.4. Resistência a insetos.....	14
2.5. Efeitos antinutricionais dos taninos.....	15
2.5.1. Efeito na digestibilidade “in vitro” da matéria seca.....	15
2.5.2. Efeito na performance de aves.....	16
2.5.3. Remoção dos taninos no grão.....	18
2.6. Métodos para determinar a presença de taninos em sorgo.....	19
2.6.1. Extração dos taninos.....	19
2.6.2. Determinação da presença de taninos....	20
2.7. Controle genético do teor de tanino em sorgo..	27

3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1. Experimento 1. Comparações entre métodos para determinar a presença de taninos em sorgo.....	31
3.1.1. Extração dos taninos.....	33
3.1.2. Determinação do teor de tanino no grão.	33
3.1.3. Experimento com aves.....	36
3.1.4. Digestibilidade "in vitro" da matéria seca.....	37
3.1.5. Análise eletroforética.....	39
3.2. Experimento 2. Análise de cruzamentos dialéli- cos parciais para o teor de tanino em sorgo...	40
3.2.1. Condução do experimento.....	40
3.2.2. Análise de variância.....	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1. Experimento 1. Comparações entre métodos para determinar a presença de taninos em sorgo.....	45
4.2. Experimento 2. Análise de cruzamentos dialéli- cos parciais para teor de tanino em sorgo.....	57
5. CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
APÊNDICE.....	75

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Estrutura de um polímero de proantocianidina (tanino).	8
Figura 2 - Padrões de eletroforese das proteínas presentes na Fração I (albuminas e globulinas) extraídas de endosperma do sorgo ou milho..	46
Figura 3 - Padrões de eletroforese das proteínas presentes na Fração II (prolaminas) extraídas de endosperma do sorgo ou milho.....	47
Figura 1A - Curva padrão de ácido tânico utilizada para o método Azul da Prússia (PRICE & BUTLER, 1977).....	76
Figura 2A - Curva padrão de catequina utilizada para o método Vanilina/HCl (PRICE et al., 1978)...	78
Figura 3A - Curva padrão de tanino purificado utilizada para o método da Proantocianidina (HAGERMAN & BUTLER, 1981).....	80

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Relação de materiais genéticos avaliados. CNPMS - Sete Lagoas, MG. 1994.	32
Tabela 2 - Composição das rações (%) à base de milho ou sorgo utilizadas para frangos de corte até 28 dias de idade. Lavras, MG. 1994...	37
Tabela 3 - Materiais genéticos avaliados em esquema de cruzamentos dialélicos parciais. CNPMS- Sete Lagoas, MG. 1994.	41
Tabela 4 - Representação esquemática da tabela dialélica (MIRANDA FILHO & GERALDI, 1984).	42
Tabela 5 - Resumo da análise de variância para a percentagem de tanino em esquema de cruzamentos dialélicos parciais (GERALDI & MIRANDA FILHO, 1988).....	44
Tabela 6 - Análise de variância para teor de tanino no grão (%) considerando os diferentes materiais genéticos avaliados e os três métodos de análise de tanino. Sete Lagoas, MG. 1994.....	48
Tabela 7 - Teor de tanino em sorgo (%) determinado pelos métodos Azul da Prússia (AP), Vanili- na/HCl (VA) e Proantocianidina (PRO). Média de quatro repetições. Sete Lagoas, MG. 1994.	50

Tabela 8 - Médias do Ganho de Peso (GP), Consumo de Ração (CR), Conversão Alimentar (CA) aos 14 e 28 dias (g) por ave e a Digestibilidade "in vitro" da matéria seca (DIVMS) para cada material genético avaliado. Média de quatro repetições. Lavras, MG. 1994.	52
Tabela 9 - Correlações entre o tgor de tanino em sorgo determinado pelos métodos Azul da Prússia (AP), Vanilina/HCl (VA), Proantocianidina (PRO) e o Ganho de Peso (GP), Consumo de Ração (CR), Conversão Alimentar (CA) aos 14 e 28 dias e a Digestibilidade "in vitro" da matéria seca (DIVMS). Lavras, MG. 1994.	56
Tabela 10 - Teor de tanino (%) equivalente ácido tânico das linhagens e dos híbridos. Média de 3 repetições. Sete Lagoas, MG. 1994..	58
Tabela 11 - Análise de variância da tabela dialética para teor de tanino no grão. Sete Lagoas, MG. 1994.	59
Tabela 12 - Estimativas da capacidade geral de combinação (g_i e g_j) e capacidade específica de combinação (s_{ij}) para teor de tanino no grão. Sete Lagoas, MG. 1994.	60

TANINO EM SORGO: MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO E ANÁLISE GENÉTICA

Autor: **WALTER ALVARENGA RODRIGUES**

Orientador: **Prof. Dr. GERALDO ANTONIO TOSELLO**

RESUMO

O sorgo, diferentemente de outros cereais, produz relativamente grande quantidade de compostos fenólicos, entre os quais os taninos. No campo, estes compostos protegem o sorgo contra o dano causado por pássaros, reduzem a germinação do grão na panícula e conferem resistência ao desenvolvimento de fungos causadores da podridão no grão antes da colheita.

Ao contrário destes benefícios no campo os taninos causam efeitos indesejáveis na dieta. Eles podem formar complexos com as proteínas e assim diminuir a sua digestibilidade e palatabilidade.

A determinação dos taninos em sorgo apresenta vários problemas. Os métodos colorimétricos geralmente não diferenciam taninos de outros compostos fenólicos, outro problema é a dificuldade de obtenção de substâncias adequadas para serem utilizadas como padrão para estes métodos. Por causa desses problemas, muitos trabalhos utilizam a precipitação de proteínas pelos taninos para sua determinação, mas as diferenças na conformação destas moléculas podem influenciar a interação entre taninos e proteínas e assim causarem resultados divergentes.

Assim, os objetivos deste estudo foram: a) comparar métodos de determinar a presença de taninos em sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]; b) correlacionar o teor de tanino com a performance de aves e a digestibilidade da matéria seca; c) detectar a presença de taninos através de análises eletroforéticas das proteínas de reserva do grão; d) estimar componentes genéticos de médias para teor de tanino no grão, no sentido de orientar programas de melhoramento genético visando selecionar genótipos de sorgo com boas qualidades nutritivas e resistentes a pássaros.

Foram comparados os métodos Azul da Prússia, Vanilina/HCl e Proantocianidina e, na condução do experimento com aves, foram utilizadas dez rações diferentes à base de sorgo e uma ração à base de milho.

Os resultados mostraram que o teor de tanino variou conforme a metodologia utilizada. A presença de compostos fenólicos determinada pelo método Azul da Prússia apresentou maior correlação com o ganho de peso das aves e a digestibilidade "in vitro" da matéria seca. As análises eletroforéticas das proteínas albuminas, globulinas e prolaminas permitiram detectar a presença de taninos em sorgo.

Visando estimar componentes genéticos de médias para teor de tanino no grão, foi conduzido um experimento em esquema de cruzamentos dialélicos parciais (5 x 4) em que se definiu como parentais do grupo 1 as linhagens com ausência de tanino e parentais do grupo 2 as linhagens com presença de tanino. Utilizou-se o método Azul da Prússia para a determinação dos fenóis totais no grão.

Os resultados mostraram que o teor de fenóis variou entre 0,110% e 0,290% equivalente ácido tânico (ausência de tanino) para as linhagens do grupo 1 e entre 1,869% e 2,753% (presença de tanino) para as linhagens do grupo 2. Os híbridos apresentaram valores entre 0,897% e 2,067%. As linhagens CMSXS 116 R e RED HULL apresentaram as maiores estimativas para a capacidade geral de combinação, podendo ser utilizadas em programas de melhoramento, visando obter grãos de sorgo com tanino. Por outro lado, as linhagens IS 3981 e SC 103-12 apresentaram as menores estimativas para a capacidade geral de combinação sendo indicadas para serem utilizadas em programas de melhoramento visando eliminar o tanino do grão. Os híbridos CMSXS 116 R X CMSXS 110 B e IS 3981 X SC 103-12 apresentaram as maiores estimativas da capacidade específica de combinação e o híbrido CMSXS 116 R X RED HULL a menor estimativa, mostrando que estas linhagens se complementam com alelos favoráveis para presença ou ausência do tanino no grão, respectivamente.

TANNINS IN SORGHUM: METHODS OF DETERMINATION AND GENETIC ANALYSIS

Author: **WALTER ALVARENGA RODRIGUES**

Adviser: **Prof. Dr. GERALDO ANTONIO TOSELLO**

SUMMARY

Sorghum, unlike other cereals, produces relatively large amounts of phenolic compounds, including the tannins. In the field, these polyphenols protect the sorghum against bird damage, reduce preharvest germination and protect the plant against fungal pathogens preharvest seed molding.

In contrast to these beneficial effects in the field, sorghum tannins have undersirable effects in the diet. They can form complexes with dietary proteins and reduce their digestibility and palatability.

The determination of tannins in sorghum presents several major problems. The colorimetric methods generally suffer from the chemical similarity between tannins and other phenolic compounds, other problem is difficulty of obtaining adequate amounts of a suitable standard for the assays. Because of these problems, many workers have preferred to use the protein precipitation property as the bases for their estimation, but possible differences in molecular shape can influence the interaction between tannins and protein and thus cause divergent results.

Thus, the objectives of this study were: a) compare assays to detect the presence of tannins in sorghum

[*Sorghum bicolor* (L.) Moench]; b) correlate tannin content with chicks performance and digestibility of the dry matter; c) detect presence the tannins through electrophoretic analysis in grain storage proteins; d) estimate average genetic components in tannin content in the grain, giving the possibility to orientate genetic breeding programs which will search for sorghum with good nutritive quality and resistance to bird damage.

In order to compare the different assays for presence of tannins in grain sorghum, it was carried out an experiment with chicks, including an analysis of digestibility "in vitro" of the dry matter. The assays evaluated were: Prussian Blue, Vanillin/HCl and Proanthocyanidin. In order to feed the chicks it was prepared rations from ten different genotypes of sorghum and one maize variety.

The results showed that tannin content varied according to the methodology used. The presence of phenolic compounds detected by the Prussian Blue assay resulted in a greater correlation with chicks weight gain and the dry matter digestibility "in vitro". Electrophoretic analysis of albumins, globulins and prolaminis on SDS gels showed that banding patterns of these proteins can be correlated with presence or absence of tannin in the sorghum grains.

To estimate the genetic average components for tannin content in the grain, an experiment of partial diallel crosses (5 x 4) was carried out. Inbreds with no tannin was identified as parents of group 1 and parents of group 2 the inbreds with tannin. The method of Prussian

Blue was used to determine the total phenols contents in the grain.

The results showed that phenol content in the grain varied between 0,110% and 0,290% equivalent tannic acid (absence of tannin) for the inbreds of group 1 and 1,869% to 2,753% (presence of tannin) for the group 2. The hybrids showed values between 0,897% and 2,067%. The inbreds CMSXS 116 R and RED HULL resulted in the greatest value for general combining ability which can be used in plant breeding programs, intending to obtain sorghum grain with tannin. On the other hand the inbreds IS 3981 and SC 103-12 resulted in the lowest estimative for the general combining ability being indicated for breeding programs with the objective to obtain no tannin in the grain. The hybrids CMSXS 116 R X CMSXS 110 B and IS 3981 X SC 103-12 resulted the greatest estimative for the specific combining ability and the hybrid CMSXS 116 R X RED HULL the lowest value, showing that these inbreds are complementary to each other having favorable alleles for presence or absence of tannin in the grain.

1. INTRODUÇÃO

Os taninos são considerados polímeros de compostos fenólicos resultantes do metabolismo secundário das plantas (BUTLER, 1989a). São comuns em sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] e quando presente, conferem resistência a pássaros (RODRIGUES et al., 1992), aos fungos causadores da podridão no grão (HARRIS & BURNS, 1973), além de reduzir a germinação do grão antes da colheita (HARRIS & BURNS, 1970). Entretanto, estes compostos fenólicos formam complexos com proteínas através de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, reduzindo a digestibilidade e a palatabilidade dos alimentos, causando em consequência o menor ganho de peso aos animais (BUTLER, 1989b). Desta forma, numerosos esforços são conduzidos por pesquisadores, no sentido de reduzir os efeitos indesejáveis causados pelos taninos, enquanto se mantém ou melhora as vantagens agronômicas que os compostos fenólicos conferem.

Muitos métodos para determinar a presença de taninos são descritos na literatura e novas metodologias são apresentadas regularmente. A escolha de um método apropriado pode parecer difícil para um não especialista. Nenhum dos métodos disponíveis é universalmente aceito como ideal ou utilizado de forma unânime. Por exemplo, métodos que medem compostos fenólicos totais correlacionam com dados biológicos em alguns estudos, por outro lado, em

outros estudos, os métodos que correlacionam bem com estes dados biológicos, são aqueles que utilizam a capacidade dos taninos de precipitar as proteínas. Assim, o conhecimento dos princípios fundamentais da análise de tanino pode auxiliar o pesquisador a selecionar o melhor método a partir daqueles disponíveis (HAGERMAN & BUTLER, 1989).

Existe uma dificuldade em quantificar os taninos em sorgo, isto porque os métodos disponíveis apresentam vários problemas. O primeiro é que os taninos são contaminados por compostos fenólicos que não precipitam proteínas. Assim, métodos que medem compostos fenólicos totais não são satisfatórios. O segundo maior problema é a dificuldade de isolamento de taninos, com estrutura conhecida para usá-los como padrão. Terceiro, ambos tanino hidrolizável e tanino condensado precipitam proteínas, mas eles são do ponto de vista químico, completamente diferentes (HOSENEY et al., 1981).

Os métodos disponíveis para quantificar taninos podem ser divididos em duas classes: a) métodos que utilizam as propriedades químicas, ou seja, a capacidade dos compostos fenólicos reagirem com outras substâncias e desenvolverem cor; b) métodos que utilizam as propriedades físicas, isto é, a capacidade dos compostos fenólicos se associarem e precipitarem as proteínas (MAKKAR, 1989).

A vantagem do método de precipitação de proteínas é que eles medem a atividade biológica dos taninos nos alimentos ou forragem (MAKKAR, 1989). Porém, diferenças no peso e conformação molecular dos taninos podem influenciar a interação entre tanino e proteína e, assim, causar resultados divergentes (HOSENEY et al., 1981).

Os métodos colorimétricos são amplamente utilizados, principalmente devido a sua simplicidade e sensibilidade. Estes incluem: Folin-Ciocalteu, Folin-Denis e Azul da Prússia para fenóis totais, Vanilina/HCl para catequina e butanol-HCl para proantocianidina. Entretanto, estes não são específicos e não distinguem fenóis de baixo peso molecular (que não têm efeito adverso na qualidade nutricional) de polifenóis que afetam a qualidade nutricional, segundo revisão de MAKKAR (1989).

Uma metodologia utilizada pela indústria para detectar a presença de taninos em sorgo por ocasião da comercialização do produto, utiliza soluções de hidróxido de potássio e hipoclorito de sódio, os quais, através de reações de oxidação com compostos fenólicos, produzem cor escura no grão e assim a mercadoria do produtor é desvalorizada ou rejeitada. Esta metodologia produz resultados imprecisos uma vez que numerosos compostos químicos, que não são taninos, como por exemplo o peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico, e que estão presentes no grão de sorgo podem participar destas reações de oxidação e promover o desenvolvimento de cor.

Atualmente, existe a necessidade de se utilizar um método para quantificar o teor de tanino em sorgo que forneça resultados rápidos e precisos possibilitando sua utilização em programas de melhoramento genético, visando obter sorgo com boas qualidades nutritivas e resistentes a pássaros, além de possibilitar a comercialização do sorgo com preços mais justos.

No Brasil, além desta necessidade de se utilizar uma metodologia adequada para determinar a presença de taninos, os programas de melhoramento genético

que visam obter sorgo com boas qualidades nutritivas e resistentes a pássaros são conduzidos sem a melhor escolha dos parentais que possibilitam obter populações segregantes promissoras.

Assim sendo, os objetivos deste estudo foram:

- a) Comparar três métodos de determinar o teor de tanino em grãos de sorgo.
- b) Correlacionar o teor de tanino com a performance de aves e a digestibilidade "in vitro" da matéria seca.
- c) Identificar a presença de taninos através de análises eletroforéticas das proteínas de reserva do grão.
- d) Estimar componentes genéticos de médias para teor de tanino no grão, visando orientar o melhorista na seleção de linhagens com boa capacidade de combinação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O Sorgo: Origem, distribuição e utilização

O sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] é originário da África. Atualmente é o 5º cereal em importância no mundo, após o trigo, arroz, milho e cevada. Ao contrário dos países industrializados, o sorgo é particularmente importante para os países em desenvolvimento, onde o grão é muito utilizado na alimentação humana (GUALTIERI & RAPACCINI, 1990). Este fato tem sido verificado nos países da África e Ásia (MONTGOMERY et al., 1986). Nos últimos anos, observou-se uma produção crescente de sorgo nos Estados Unidos, México, Argentina e vários países da América Central (HAHN et al., 1984).

No Brasil, a cultura do sorgo não conseguiu estabilizar sua produção e evoluir em termos de crescimento de área e quantidade produzida. A produção brasileira de sorgo, na safra de 1992/93, representou apenas 0,96% da produção de milho e a área plantada representou 1,21% da área plantada com milho (RELATÓRIO TÉCNICO ANUAL DO CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE MILHO E SORGO 1992-1993, 1994).

Infelizmente, o sorgo não é considerado de interesse para a indústria de alimentos devido à heterogeneidade de suas características bromatológicas e a

presença de fatores antinutricionais como os compostos fenólicos em alguns cultivares (GUALTIERI & RAPACCINI, 1990).

2.2. Natureza química dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos em sorgo podem ser divididos em três grupos básicos: ácidos fenólicos, flavonóides e taninos (HAHN et al., 1984).

Os ácidos fenólicos são derivados do ácido benzóico (ex: ácido vanílico) ou ácido cinâmico (ex: ácido ferúlico). São ácidos livres, solúveis ou insolúveis em ésteres, encontrados nas camadas externas dos grãos como pericarpo, testa e aleurona. No endosperma do grão são encontrados principalmente os ácidos fenólicos insolúveis e estão associados à parede celular (HAHN et al., 1984).

Os ácidos fenólicos não tem efeito adverso na qualidade nutricional, no entanto, podem causar cor indesejável aos alimentos quando processados sob condições alcalinas como as tortilhas por exemplo (HAHN et al., 1984).

Os flavonóides constituem-se em um amplo grupo de compostos fenólicos encontrados nas plantas. Compostos denominados flavones, flavonols e flavans são considerados os principais componentes deste grupo, sendo que os flavans são encontrados em maior quantidade em sorgo. Antocianidina (flavan-3-en-3-ols) é o maior constituinte dos flavans. Flavan-3-ols e flavan-3,4-diols são conhecidos por catequina e leucoantocianidina respectivamente, e estão entre os principais pigmentos encontrados em vegetais (HAHN et al., 1984).

Os taninos compreendem um grupo de compostos fenólicos resultantes do metabolismo secundário das plantas, ou seja, não são necessários ao crescimento e reprodução das plantas (BUTLER et al., 1984). São encontrados principalmente em frutos verdes e plantas da família poaceae (HAHN et al., 1984). No grão de sorgo, são localizados principalmente na testa (EARP et al., 1983), que é um tecido altamente pigmentado localizado logo abaixo do pericarpo em alguns cultivares de sorgo (ROONEY & SULLINS, 1976).

Além da presença de taninos na testa, sua ocorrência também tem sido verificada no pericarpo e outras partes da planta (BULLARD et al. 1981 e GLENNIE, 1983). Esta presença de taninos no pericarpo se deve ao gene "spreader" que possibilita a síntese de compostos fenólicos em outros tecidos (HAHN et al., 1984).

O termo tanino origina-se da expressão "tanning" que significa curtir a pele dos animais, transformando-a em couro (HAHN et al., 1984). Isto é possível porque os taninos se ligam ao colágeno que é uma proteína constituinte da pele dos animais (BUTLER et al., 1984).

Existem duas classes de taninos: hidrolizáveis e condensados. Os taninos hidrolizáveis (ex: ácido tânico) são compostos de um açúcar e um ácido fenolcarboxílico e são hidrolizados por enzimas ou ácidos. Ao contrário, os taninos condensados não são afetados por enzimas, mas decompõem-se quando tratados com ácidos, formando pequena quantidade de antocianidina, sendo classificados desta forma como proantocianidina. Quimicamente, os taninos condensados são polímeros de hidroxiflavan-3-ol (Figura 1)

ou hidroxiflavan-3,4-diols ou polímeros resultantes da combinação destas duas classes de compostos (HOSENEY et al., 1981 e HAHN et al., 1984).

Figura 1 - Estrutura de um polímero de proantocianidina (tanino).

Não existem evidências de que o sorgo contém quantidades significativas de tanino hidrolizável. Por outro lado, os cultivares de sorgo, resistentes à pássaros, contêm tanino condensado no grão (HOSENEY et al., 1981).

2.3. Formação do complexo tanino-proteína

Uma característica importante dos taninos é a sua capacidade de se associar às proteínas (BUTLER, 1989b). Numerosos estudos são conduzidos no sentido de elucidar o modo específico da interação entre tanino e proteína e vários mecanismos desta interação são propostos (OH et al., 1980). Uma destas propostas admite que a formação e a estabilidade do complexo tanino-proteína se deve

principalmente a formação de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre estas moléculas (BUTLER et al., 1984).

As proteínas diferem quanto a sua afinidade pelos taninos. BUTLER (1982a) relaciona algumas características das proteínas que são importantes para a sua associação com os taninos:

a) Peso molecular

Proteínas maiores, com alto peso molecular, associam-se mais fortemente aos taninos. Por sua vez, peptídeos menores formados por 2 a 4 aminoácidos se ligam mais fracamente aos compostos fenólicos.

b) Estrutura das proteínas

Proteínas mais abertas e flexíveis tem maior afinidade pelos taninos. Por outro lado, proteínas globulares que são mais compactas possuem menor afinidade pelos compostos fenólicos.

c) Ponto isoelétrico

A afinidade das proteínas pelos taninos é maior no ponto isoelétrico da proteína, embora algumas proteínas se associam aos taninos em um amplo limite de pH.

d) Conteúdo de prolina

Talvez o mais importante fator que interfere na associação entre taninos e proteínas em sorgo é a quantidade de prolina no polipeptídeo. As proteínas ricas em prolina, como as zeínas no milho ou kafirina no sorgo, são lineares, uma vez que este aminoácido não se insere em

uma estrutura em α -hélice, assim, aumenta-se a superfície de contato do polipeptídeo.

Esta seletividade dos taninos pelas prolaminas, do ponto de vista nutricional, pode ser considerada menos prejudicial, isto porque os taninos formarão complexos, preferencialmente, com proteínas de qualidade nutricional inferior, deficientes em alguns aminoácidos essenciais como lisina e triptofano (BUTLER, 1989c).

A afinidade dos taninos pelas proteínas ricas em prolina altera sua distribuição durante o fracionamento, causando no extrato, diferentes classes de solubilidade (BUTLER, 1989b). Assim, em cultivares de sorgo com tanino, observa-se a redução das frações proteicas solúveis em álcool (prolaminas) e também em solução salina (albuminas e globulinas) e o aumento da fração representada pelas glutelinas (JAMBUNATHAN & MERTZ, 1973; GUIRAGOSSIAN et al., 1978).

Quanto à estrutura e propriedade dos polifenóis que são importantes para a formação do complexo tanino-proteína, três características devem ser consideradas, segundo revisão de SPENCER et al. (1988):

a) Tamanho da molécula do polifenol: moléculas maiores são mais eficazes na associação com a proteína.

b) Conformação flexível do polifenol: quando a molécula sofre retração, facilita a ligação do polifenol a sítios da proteína.

c) Solubilidade do polifenol: uma relação inversa existe entre a força de associação com a proteína e a solubilidade em água do polifenol. Baixa solubilidade favorece fortemente esta associação.

2.4. Benefícios agronômicos dos taninos

2.4.1. Resistência a pássaros

Em muitas regiões onde se cultiva o sorgo, o dano causado por pássaros é bastante severo podendo ocasionar a perda total da cultura. Por esta razão, a obtenção de cultivares resistentes a pássaros é parte integrante de muitos programas de melhoramento (McMILLIAN et al., 1972 e TIPTON et al., 1970).

O dano causado por pássaros ocorre principalmente nas fases de grão leitoso e pastoso e a resistência nestas fases se deve à adstringência causada pelos taninos ao formarem complexos e precipitarem as proteínas no momento em que o grão é ingerido (HAHN et al., 1984). Assim, os pássaros preferem consumir outros alimentos mais palatáveis que sorgo com tanino, o que evidencia a não preferência como mecanismo de resistência (McMILLIAN et al., 1972).

A resistência a pássaros devido a presença de taninos foi demonstrada por diversos autores. Avaliando diversos materiais genéticos nas fases de grão leitoso, grão pastoso, maturação fisiológica e fase de colheita, RODRIGUES et al. (1992) observaram o início do dano na fase de grão pastoso sendo que todos os materiais com tanino foram resistentes. As correlações entre a presença de tanino e o dano causado por pássaros foram altas e significativas na fase de grão pastoso ($r = -0,67$) e nas fases de maturação fisiológica e de colheita ($r = -0,77$).

Resultado semelhante foi obtido por McMILLIAN et al. (1972) que avaliaram diversos materiais genéticos e

verificaram uma correlação negativa ($r = -0,62$) entre a presença de tanino no grão e o dano causado por pássaros.

Cultivares de sorgo resistentes e susceptíveis a pássaros foram avaliados por TIPTON et al. (1970). Os resultados mostraram que o teor de ácido tânico e compostos adstringentes totais foram oito e quatro vezes maior em híbridos resistentes do que em híbridos susceptíveis, respectivamente.

A existência de cultivares de sorgo sem tanino e resistentes a pássaros foi observada por alguns pesquisadores (McMILLIAN et al., 1972; SUBRAMANIAN et al., 1983 e BUTLER, 1989d). Dois cultivares de sorgo com ausência de tanino e bons níveis de resistência a pássaros, CMSXS 180R e CMSXS 181R, foram desenvolvidos no Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS/EMBRAPA). Uma outra variedade proveniente do Arkansas (EUA) também foi identificada pelo Dr. Butler do Departamento de Bioquímica da Universidade de Purdue. Trabalho em colaboração entre a EMBRAPA/CNPMS e o Dr. Butler permitiu o isolamento do componente responsável por esta resistência, um glicosídeo cianogênico denominado dhurrin que em testes com ratos e pintos não mostrou efeitos antinutricionais. Atualmente, o CNPMS vem desenvolvendo a metodologia para extrair e quantificar o dhurrin com a finalidade de dar suporte ao desenvolvimento de cultivares melhoradas (PRATES et al., 1996; SCHAFFERT et al., 1996).

Além da possibilidade de identificação e incorporação aos cultivares de sorgo sem tanino de compostos químicos que conferem resistência a pássaros como o dhurrin, outra estratégia que poderia ser adotada em programas de melhoramento genético seria a obtenção de

materiais com tanino nas fases de grão leitoso e pastoso, quando os pássaros causam maior dano, e ausência de tanino nas fases de maturação fisiológica e de colheita (RODRIGUES et al., 1992).

É importante ressaltar que ao avaliar o dano, deve-se considerar fatores como a população de pássaros e a disponibilidade de outros alimentos mais palatáveis que sorgo com tanino (HARRIS et al., 1970). Se a população de pássaros for grande e não houver outros alimentos disponíveis em quantidade suficiente, o dano poderá ser total, inclusive em cultivares de sorgo com tanino (HOSENEY et al., 1981; BUTLER, 1989b e RODRIGUES, 1991).

2.4.2. Resistência aos fungos causadores da podridão no grão antes da colheita

A ocorrência de temperaturas elevadas e altas umidades por ocasião da maturação do sorgo, pode favorecer o desenvolvimento de fungos, causando a deterioração dos grãos comprometendo a produção e sua qualidade (HARRIS & BURNS, 1973).

Avaliando diversos híbridos em dois locais quanto a incidência de fungos na panícula, HARRIS & BURNS (1973) verificaram uma correlação negativa ($r = -0,89$ e $r = -0,92$) entre o teor de tanino no grão e o dano causado pelos fungos.

Segundo BUTLER (1989d), a resistência a estes fungos se deve principalmente a presença de flavan-4-ols. JAMBUNATHAN et al. (1986) verificaram níveis duas a três vezes mais altos de flavan-4-ols em cultivares resistentes que em susceptíveis. Os ácidos fenólicos também conferem

resistência aos fungos, HAHN et al. (1983) verificaram maior quantidade destes compostos fenólicos em cultivares resistentes que em cultivares susceptíveis.

De acordo com BUTLER (1982a), os taninos tem alta afinidade por certas proteínas produzidas pelos patógenos, esta seletividade é análoga à ação dos anticorpos em animais.

2.4.3. Redução na germinação de grãos na panícula

A germinação de grãos de sorgo antes da colheita ocorre durante os períodos prolongados de chuva onde as altas temperaturas favorecem a germinação (HARRIS & BURNS, 1970).

Avaliando diversos híbridos após 5 (cinco) dias contínuos de chuva, HARRIS & BURNS (1970) verificaram uma correlação negativa e altamente significativa ($r = -0,83$) entre o teor de tanino e a germinação de grãos na panícula. Segundo os autores, provavelmente os taninos estão envolvidos no mecanismo de dormência uma vez que, ao se concentrarem na testa, podem retardar a absorção de água e atrasar a germinação, além disso, eles podem formar complexos e inativar enzimas envolvidas no processo de germinação do grão.

2.4.4. Resistência a insetos

Os ácidos fenólicos ou flavan-4-ols são exemplos de compostos fenólicos que são repelentes aos insetos, como os afídeos, na fase inicial de crescimento do sorgo. Por outro lado, os compostos fenólicos são

ineficientes contra os insetos que se alimentam de grãos armazenados (BUTLER, 1989b).

2.5. Efeitos antinutricionais dos taninos

2.5.1. Efeito na digestibilidade "in vitro" da matéria seca

A formação do complexo tanino-proteína é um dos fatores responsáveis pela diminuição da digestibilidade e disponibilidade de proteínas, o que limita a utilização de sorgo com tanino na dieta (SHAFFERT et al., 1974).

Cultivares de sorgo com grãos de coloração marrom apresentaram menores valores para a digestibilidade "in vitro" da matéria seca do que cultivares com grãos de coloração branca, vermelha ou amarela em estudos conduzidos por HARRIS et al. (1970), que verificaram também uma correlação negativa ($r = -0,90$) entre o teor de tanino no grão e a digestibilidade. Os autores observaram que a proteção de panículas com sacolas antes ou imediatamente após ao florescimento reduziu sensivelmente o teor de compostos fenólicos aumentando a digestibilidade do sorgo com tanino no grão.

Avaliando diversos híbridos de sorgo nos estádios de grãos leitoso, pastoso e maturação fisiológica, MONTGOMERY et al. (1986) verificaram uma correlação negativa ($r = -0,66$) entre o teor de tanino no grão e a digestibilidade da matéria seca no estágio de grão pastoso.

Com objetivo de avaliar o efeito do tanino e a adição de uréia na digestibilidade "in vitro" da matéria seca e da proteína do grão de sorgo, SHAFFERT et al. (1974)

verificaram que após 48 horas de fermentação, a digestibilidade da matéria seca dos materiais foram 72,5% para sorgo sem tanino e 46,4% para sorgo com tanino, com a adição de uréia estes valores aumentaram para 93,4% e 79,2% respectivamente. Após 96 horas de fermentação os valores observados foram de 93,8% e 85,8%, mostrando uma diferença verdadeira de 8 unidades entre os dois tipos de sorgo. Quanto a digestibilidade da proteína, não houve efeito da adição de uréia que apresentou valores de 88,2% para sorgo sem tanino e 69,6% para sorgo com tanino.

Estudos conduzidos por ROSTAGNO et al. (1973a) mostraram que a suplementação de proteínas à dieta para aves contendo 1,41% de ácido tânico resultou em um aumento de 4 vezes na excreção de aminoácidos. A adição de ácido tânico ao sorgo sem tanino para atingir níveis de 1,41% de tanino reduziu a digestibilidade dos aminoácidos. Para o sorgo sem tanino a digestibilidade foi de 73% enquanto que para o sorgo com tanino 22% e sorgo sem tanino mais ácido tânico, a digestibilidade foi de 63%.

2.5.2. Efeito na performance de aves

Os taninos reduzem a taxa de crescimento e aumenta o nível de nitrogênio excretado pelos animais. Estes efeitos antinutricionais se devem a associação dos taninos com as proteínas da dieta (BUTLER, 1989c). Os animais respondem rapidamente à dieta com tanino com hipertrofia da glândula parótida com produção de proteínas ricas em prolina (45% de prolina). Estas proteínas constituem, assim, em um mecanismo de defesa contra a dieta rica em tanino (BUTLER et al., 1984).

Na dieta, os taninos produzem cor indesejável à ração e devido à adstringência diminuem sua palatabilidade (BUTLER & ROGLER, 1985).

Diferenças significativas no ganho de peso de aves foram observadas por BANDA-NYIRENDA et al. (1987) quando utilizaram nas rações, sorgo contendo diferentes teores de tanino no grão. Algumas aves alimentadas com rações à base de sorgo sem tanino apresentaram ganho de peso superior àquelas que receberam dieta à base de milho.

A substituição total ou parcial do milho pelo sorgo com tanino e sem tanino nas rações para aves foi analisada por QUEIROZ et al. (1978), que verificaram menor ganho de peso das aves alimentadas com sorgo contendo tanino no grão. Os resultados mostraram também que não houve influência no ganho de peso quando o milho foi substituído pelo sorgo sem tanino em até 100% e até 75% pelo sorgo com tanino. A substituição total do milho pelo sorgo provocou um aumento na conversão alimentar de 13,6% para sorgo com tanino e 9,9% para sorgo sem tanino.

Com objetivo de avaliar a performance de aves alimentadas com dieta à base de sorgo com tanino, sem tanino e milho, ROSTAGNO et al. (1973b), verificaram também um menor crescimento e maior conversão alimentar das aves alimentadas com rações à base de sorgo com tanino. As aves alimentadas com rações à base de milho apresentaram maior ganho de peso e em alguns casos, melhor conversão alimentar. A adição de ácido tânico, ao nível de sorgo com tanino, resultou em menor ganho de peso das aves, no entanto, quando aminoácidos essenciais foram adicionados ao mesmo nível do milho, à dieta de sorgo com tanino, verificou-se um melhor desempenho das aves.

Avaliando a performance de aves alimentadas com rações à base de sorgo contendo diferentes concentrações de tanino, ELKIN & ROGLER (1991), verificaram redução de 33% no ganho de peso aos 17 dias. No entanto, a suplementação da dieta com metionina, melhorou a performance das aves que receberam sorgo com tanino, porém, o ganho de peso destas aves permaneceu menor que as aves alimentadas com sorgo sem tanino.

2.5.3. Remoção dos taninos no grão

É essencial manter as vantagens agronômicas associadas aos taninos e ao mesmo tempo encontrar meios para vencer sua característica antinutricional. Para tanto, pode-se realizar a remoção química ou física de pigmentos fenólicos da camada externa do grão de sorgo com tanino (MWASARU et al., 1988).

Vários trabalhos em que os autores obtiveram sucesso utilizando a remoção química dos taninos com água, HCl ou substâncias básicas como hidróxido de amônio, hidróxido de potássio ou hidróxido de sódio são relacionados por HOSENEY et al. (1981).

Por outro lado, a remoção mecânica de pigmentos fenólicos das camadas externas do grão de uma variedade de sorgo com tanino e outra sem tanino foi realizada por CHIBBER et al. (1978). O procedimento abrasivo permitiu a remoção de até 37% das camadas externas do grão após 3 ciclos de remoção com redução de aproximadamente 45% do conteúdo de proteína e 98% de tanino nas amostras. Em decorrência deste procedimento, verificou-se uma redução progressiva dos aminoácidos

lisina, histidina e arginina. Observou-se também alteração da distribuição das proteínas durante o fracionamento, com aumento das prolaminas representadas pela kafirina e redução das albuminas e globulinas para a variedade sem tanino. Na variedade com tanino, verificou-se um aumento das frações albuminas, globulinas e prolaminas (kafirina) e redução das glutelinas. Estes resultados mostraram que as frações das proteínas não estão igualmente distribuídas no grão de variedades com tanino ou sem tanino. Os autores concluíram com este estudo que a kafirina é uma proteína de reserva do sorgo que se localiza, em sua maior parte, nas regiões mais internas do grão.

2.6. Métodos para determinar a presença de taninos em sorgo

O maior interesse pela adequação de métodos de determinar a presença de taninos em sorgo, iniciou-se na década de 70 quando BURNS (1971) propôs o método Vanilina/HCl, amplamente utilizado para forragens e modificado para permitir uma rápida estimativa do teor de tanino em grãos de sorgo. O método proposto foi altamente correlacionado com a digestibilidade e mostrou ser simples, rápido e específico para compostos adstringentes.

2.6.1. Extração dos taninos

Para a determinação da presença de taninos nos grãos de sorgo, é necessária a extração destes compostos. BURNS (1971) propôs a extração por uma noite com metanol apenas, posteriormente, MAXON & ROONEY (1972) verificaram

maior eficiência na extração dos taninos com uma solução de metanol a 1% em HCl. Este procedimento foi confirmado por PRICE et al. (1978) que recomendaram 20 minutos para a extração dos taninos.

2.6.2. Determinação da presença de taninos

Os procedimentos mais comuns para determinar a presença de taninos em sorgo podem ser classificados em métodos colorimétricos que são apropriados para quantificar e determinar a natureza química dos taninos e métodos que utilizam a propriedade dos taninos de se associar e precipitar as proteínas determinando sua atividade biológica nas amostras (HAGERMAN & BUTLER, 1989).

a) Métodos colorimétricos

Os métodos colorimétricos podem ser divididos em 2 grupos básicos: aqueles em que as reações ocorrem com grupos fenólicos gerais, envolvendo as reações de oxirredução ou formação de complexos com íons metálicos e aqueles em que as reações ocorrem com um grupo funcional específico devido a uma estrutura em particular dos taninos. Quando interpretamos dados referentes a estes métodos, é essencial termos um completo conhecimento da especificidade de cada método (HAGERMAN & BUTLER, 1989).

Os métodos Folin-Denis e Azul da Prússia quantificam fenóis totais e se baseiam nas reações de oxirredução entre os compostos fenólicos e íons metálicos. Estes métodos não discriminam entre taninos e compostos fenólicos que não são taninos ou entre compostos fenólicos

e outras substâncias facilmente oxidáveis como o ácido ascórbico, por exemplo (HAGERMAN & BUTLER, 1989). Contudo, nenhuma variedade de sorgo parece ter bastante compostos fenólicos que não são taninos que cause erro significativo (PRICE & BUTLER, 1977).

O método Folin-Denis fundamenta-se na redução em meio alcalino do fosfomolibdato-fosfotungstato pelos fenóis, a molibdênio de coloração azul. Outras substâncias redutoras também podem reagir produzindo coloração azul, tais como: sulfitos, ácido sulfuroso, peróxido de hidrogênio, aminas aromáticas, compostos insaturados alifáticos, glicose e ácido ascórbico (A.O.A.C., 1960).

O método Azul da Prússia é utilizado para análise geral de fenóis porque é menos susceptível a interferência de proteínas que o método Folin-Denis (HAGERMAN & BUTLER, 1989). A base química deste método é a redução pelos grupos hidroxil-fenólicos de íons Fe^{+3} a Fe^{+2} que é complexado com ferrocianeto para produzir pigmentos de coloração azul (BUTLER, 1982a).

Os métodos em que ocorre a formação de complexos entre íons metais e grupos fenólicos são mais específicos que os métodos de oxi-redução uma vez que a cor desenvolvida pelo complexo depende do padrão de substituição na estrutura da molécula de tanino. Normalmente, utiliza-se para esta metodologia, íons férrico que reage com compostos fenólicos em meio básico para formar complexos com a fórmula geral $\text{Fe}(\text{OR})_6^{-3}$, onde (OR^-) representa o fenol ionizado. Vários compostos fenólicos, incluindo tanino condensado e tanino hidrolizável, formam complexos de cor violeta com íons férricos em solução

contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) e Trietanolamina (HAGERMAN & BUTLER, 1989).

Em soluções neutras, os taninos condensados e os taninos hidrolizáveis formam complexos com íons férricos com cores distintas. Os taninos condensados produzem complexos de cor verde, enquanto os taninos hidrolizáveis produzem complexos de cor azul (HAGERMAN & BUTLER, 1989).

Métodos para quantificar taninos através da formação de complexos com metais não são muito utilizados, são apropriados para determinar fenóis totais em amostras contendo materiais que sofrem interferência com outros métodos redox. Estes métodos também detectam compostos fenólicos que não são taninos (HAGERMAN & BUTLER, 1989).

Os métodos que detectam grupos funcionais específicos dos taninos exploram as diferenças estruturais que ocorrem na molécula dos taninos, como por exemplo, as diferenças entre taninos condensados e hidrolizáveis (HAGERMAN & BUTLER, 1989).

O método butanol/HCl é específico para proantocianidina (tanino condensado). Este método é considerado o melhor para determinação dos taninos condensados. Por esta metodologia, subunidades do polímero tanino condensado são oxidados para produzir antocianidina, esta reação não envolve hidrólise. Por esta metodologia pode-se detectar também leucoantocianidina que são polímeros de flavan-3,4-diols ou flavan-4-ols (HAGERMAN & BUTLER, 1989 e WATTERSON & BUTLER, 1983).

O método Vanilina/HCl é outro exemplo de métodos que detectam grupos funcionais específicos dos taninos (HAGERMAN & BUTLER, 1989). O princípio deste método fundamenta-se na reação de leucoantocianidina

(catequina) e proantocianidina (tanino) com vanilina em presença de HCl para formar um composto de cor vermelha brilhante (HAHN et al., 1984). É um método específico para tanino condensado e alguns flavonóides como flavan-3-ol (BUTLER, 1989b).

Um parâmetro característico de considerável interesse é o grau de polimerização de proantocianidina (taninos). GLENNIE et al. (1981) mostraram que os polifenóis aumentam em tamanho durante o amadurecimento dos frutos. Esta polimerização dos taninos no sorgo durante a maturação pode ser responsável por uma aparente redução no conteúdo de tanino (DAVIS & HOSENEY, 1979 e PRICE et al., 1979).

Os métodos Vanilina/HCl e proantocianidina podem ser empregados para fornecer uma medida do grau de polimerização dos taninos condensados (BUTLER et al., 1982). O método Vanilina/HCl utilizando ácido acético em substituição ao metanol fornece uma medida da concentração molar de unidades de flavan-3-ol. A produção de antocianidina é mais utilizada para estimar o número de unidades de flavan-3-ol presente. A taxa de produção de antocianidina pelo método Vanilina/HCl em ácido acético é proporcional ao grau de polimerização (BUTLER, 1982a).

b) Padrões para determinação de taninos

Os métodos colorimétricos são amplamente utilizados, principalmente devido a sua simplicidade e sensibilidade, porém, a obtenção de substância adequada para ser utilizada como padrão é um dos problemas desses métodos (BUTLER, 1989b). Os padrões normalmente utilizados

não fornecem o mesmo espectro de absorção do tanino purificado, portanto, nenhum desses métodos são precisos para medir a quantidade de tanino condensado no grão de sorgo (HAHN et al., 1984).

Os métodos colorimétricos mais comuns determinam o teor de tanino nas amostras a partir de padrões comerciais como ácido tânico para os métodos Folin-Denis (HAHN et al., 1984) e Azul da Prússia (PRICE & BUTLER, 1977), catequina para o método Vanilina/HCl (PRICE et al., 1978) e tanino purificado de quebracho por exemplo, que é uma planta originária da América Central (BUTLER, 1989b) para o método da proantocianidina (HAGERMAN & BUTLER, 1981).

Ácido tânico é o padrão mais comum para quantificar taninos. No entanto, MAKKAR & BECKER (1993) verificaram resultados diferentes para o teor de tanino em sorgo dependendo da fonte comercial de ácido tânico utilizada e recomendam fazer as comparações com precaução entre dados de laboratórios diferentes.

Em uma avaliação do método Vanilina/HCl, PRICE et al. (1978) mostraram que o uso de catequina como padrão, superestima o conteúdo de tanino em sorgo, isto porque, as leituras de diferentes concentrações de catequina não foram lineares com as leituras de absorbância em espectrofotômetro.

O tanino purificado pode ser utilizado como padrão, porém, sua purificação é muito difícil, isto porque os extratos além de conter taninos, possuem proteínas complexadas com taninos e compostos fenólicos que não são taninos (HAGERMAN & BUTLER, 1989).

c) Métodos que utilizam a propriedade dos taninos de se associar e precipitar proteínas

Os efeitos biológicos dos taninos devem-se a sua capacidade de associar e precipitar as proteínas, assim, métodos que utilizam esta propriedade podem prever a sua atividade biológica (BUTLER, 1989c). Esses métodos são altamente correlacionados com o valor nutritivo do grão (HAHN et al., 1984).

Esses procedimentos utilizam equipamentos considerados de rotina em laboratório. As proteínas mais comuns que são adicionadas aos extratos e precipitadas pelos taninos são a hemoglobina e albumina bovina (BSA) segundo MAKKAR (1989) e HAGERMAN & BUTLER (1989). Após a centrifugação o precipitado é dissolvido por soluções detergentes alcalinas e a quantidade de tanino e proteína precipitada é medida por métodos colorimétricos (HAGERMAN & BUTLER, 1978 e MAKKAR, 1989).

A tendência dos taninos de formar complexos insolúveis com as proteínas é função de fatores que incluem características dos taninos e das proteínas relacionadas na secção 2.2 e também das condições da reação como pH, tempo de reação e concentração relativa dos reagentes (HAGERMAN & BUTLER, 1989).

Inúmeros métodos de determinar a presença de taninos utilizando sua propriedade de formar complexos e precipitar as proteínas são apresentados na literatura. Segundo MAKKAR (1989), os procedimentos mais comuns são descritos por BATE-SMITH (1973), HAGERMAN & BUTLER (1978) e A.O.A.C. (1960).

Além da precipitação de proteínas para detectar a presença de compostos fenólicos, pode-se utilizar outras substâncias com afinidade pelos taninos para sua determinação. MAKKAR (1993) propôs um método gravimétrico em que os taninos se associam ao composto insolúvel polivinil-pirrolidona (PVP) e são precipitados. A diferença de peso do extrato antes e após o tratamento com PVP que é removido por solventes orgânicos, determina a quantidade de tanino na amostra. Os valores obtidos por esta metodologia correlacionaram significativamente com o conteúdo de tanino determinado por outros métodos colorimétricos e também com métodos de precipitação de proteínas por fenóis.

d) Métodos combinados

A combinação de métodos colorimétricos e de precipitação de proteínas permite uma melhor caracterização dos taninos. Por exemplo, pode-se estimar o parâmetro atividade específica dos taninos que é definido pela relação entre a quantidade de proteína precipitada pelos taninos (HAGERMAN & BUTLER, 1980a) e o conteúdo de fenóis totais na amostra (PRICE & BUTLER, 1977). Este parâmetro pode ser utilizado para monitorar a purificação dos taninos, uma vez que a atividade específica dos taninos aumenta, à medida que compostos fenólicos que não são taninos, são removidos durante a purificação (HAGERMAN & BUTLER, 1980b e BUTLER, 1982a).

Um outro parâmetro que pode ser estimado é a relação entre tanino e compostos fenólicos que permite comparar taninos entre várias amostras de extratos

(HAGERMAN & BUTLER, 1989). Esta relação é obtida dividindo-se a quantidade de proteína precipitável pelos fenóis (HAGERMAN & BUTLER, 1978) pelos fenóis totais (PRICE & BUTLER, 1977). Esta relação permite estabelecer a quantidade de compostos fenólicos que não são taninos entre os extratos das plantas (BUTLER, 1982b).

As atividades dos taninos variam de acordo com o tamanho da molécula que é estimado pela relação entre a quantidade de proteína precipitada (HAGERMAN & BUTLER, 1980a) e as unidades de flavan-3-ol (BUTLER, 1982b). Em geral, acredita-se que polímeros de taninos de tamanho médio precipitam proteínas mais eficientemente que os polímeros de tamanhos pequenos ou grandes (HAGERMAN & BUTLER, 1989).

2.7. Controle genético do teor de tanino em sorgo

A pigmentação do pericarpo e testa no grão de sorgo se deve a compostos fenólicos que são controlados por combinações dos genes R, Y, I, B₁, B₂, S e T_p (HAHN et al., 1984).

Os genes R e Y determinam a cor do pericarpo que pode ser branco, amarelo ou vermelho. Quando os alelos do gene Y são recessivos (rryy ou R_{yy}) o pericarpo é branco. Se um dos alelos do gene Y é dominante e os alelos do gene R são recessivos (rrY_{yy}) o pericarpo é amarelo. No entanto, quando um ou ambos os alelos dos genes R e Y são dominantes (R_{yy}Y_{yy}), a cor do pericarpo é vermelha. Há ainda o gene I que controla a intensidade de cor do pericarpo, sendo que este efeito é mais pronunciado quando a cor é vermelha (HAHN et al., 1984).

A presença de pigmentos na testa é controlada pelos genes complementares B_1 e B_2 . Quando ambos são dominantes ($B_1_B_2_$) existirá pigmentação na testa. Se um ou ambos os genes possuem alelos recessivos ($b_1b_1B_2_$, $B_1_b_2b_2$ ou $b_1b_1b_2b_2$) a pigmentação é ausente (HAHN et al., 1984).

O gene S controla a presença de pigmentos e possível síntese de tanino no pericarpo. Quando um dos alelos do gene S é dominante, mais compostos fenólicos estarão presentes no pericarpo que será marrom, porém, com diferentes intensidades dependendo da sua constituição genética (branco, amarelo ou vermelho) segundo HAHN et al. (1984).

A cor púrpura da testa é observada quando os alelos do gene T_p são recessivos (t_pt_p) e marrom quando é dominante ($T_p_$) de acordo com HAHN et al. (1984).

Os cultivares de sorgo podem ser classificados de acordo com a presença ou ausência de pigmentação na testa. Assim, sorgo pertencente ao grupo I não tem pigmentação na testa ($b_1b_1B_2_$, $B_1_b_2b_2$ ou $b_1b_1b_2b_2$) e os taninos são considerados ausentes. Sorgo com pigmentação na testa e alelos do gene S recessivos ($B_1_B_2_ss$) são classificados como grupo II e possuem tanino. Aqueles com pigmentação na testa e um dos alelos do gene S dominante ($B_1_B_2_S_$) são classificados como grupo III e possuem grande quantidade de taninos na testa e no pericarpo (HAHN et al., 1984).

O efeito dos genes R , Y , B_1 , B_2 e S sobre o teor de tanino no grão de sorgo foi confirmado em experimentos conduzidos por HAHN & ROONEY (1986). Estes genes influenciaram os níveis e a localização dos compostos

fenólicos no grão. No endosperma, não se observou quantidades significativas de tanino. No entanto, verificou-se maior concentração de antocianidina no pericarpo, que possuía a cor vermelha e os alelos dos genes R e Y dominantes. Os genes B₁ e B₂ controlaram a presença de pigmentos na testa e quando o gene S foi dominante, aumentou-se os níveis de compostos fenólicos no pericarpo e testa.

Com o objetivo de estimar componentes genéticos de média para o teor de tanino no grão e verificar uma possível interação entre material genético vs fase de maturação, RODRIGUES (1991) avaliou cinco linhagens com tanino, duas linhagens sem tanino e seus respectivos híbridos em esquema de cruzamentos dialélicos parciais nas fases de grão pastoso, quando os pássaros causam maior dano ao sorgo e fase de colheita, quando é desejável a ausência de tanino no grão. Os resultados mostraram efeito significativo para a capacidade geral de combinação das linhagens com tanino e capacidade específica de combinação em ambas as fases. Verificou-se também que houve interação entre híbridos vs fase de avaliação, sendo que na decomposição desta interação constatou-se que ela só ocorreu devido à capacidade geral de combinação das linhagens com tanino, mostrando que, apesar disso, o comportamento relativo dos parentais nas duas fases foram semelhantes. Quanto à capacidade específica de combinação, apenas um híbrido apresentou estimativa positiva na fase de grão pastoso e estimativa negativa na fase de colheita, o que é um fato desejável. Contudo, esta estimativa foi muito pequena na fase de grão pastoso, indicando que,

possivelmente esse híbrido não seria eficiente com relação a resistência a pássaros.

A herança do teor de tanino em sorgo foi estudada por WOODRUFF et al. (1982) que avaliaram 13 populações F_2 e verificaram valor intermediário a alto para a herdabilidade no sentido amplo e efeito de dominância para a presença de taninos. KAN & BOYAT (1984) também avaliaram diversas linhagens e híbridos, verificando alta herdabilidade.

Estes resultados foram confirmados por BORGES (1993) que avaliou em experimentos conduzidos em dois locais, seis linhagens restauradoras de fertilidade, quatro linhagens macho-estéreis e seus respectivos híbridos em esquema de cruzamentos dialélicos parciais. Os resultados mostraram o efeito de dominância para a presença de taninos no grão, assim como a heterose significativa. A interação entre o teor de tanino vs locais foi também significativa, porém, esta interação foi menos complexa que a observada para a produtividade de grãos.

O controle genético do teor de tanino nas diversas partes da planta de cultivares de sorgo forrageiro parece ser diferente em alguns aspectos quando se compara com o teor de tanino no grão. DANGI & LUTHRA (1978) verificaram em alguns casos, heterose negativa quando utilizaram linhagens contrastantes para teor de tanino na forragem, sugerindo que a ausência de tanino é uma característica dominante.

A participação significativa da variância genética aditiva e não aditiva controlando o teor de tanino na forragem do sorgo também foi demonstrada por BOORA & LODHI, (1982).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Experimento 1: Comparações entre métodos para determinar a presença de taninos em sorgo

Para comparar os métodos de determinar a presença de taninos em sorgo e correlacioná-los com o desempenho de aves, foi conduzido um experimento em que se utilizou nas rações, os materiais genéticos apresentados na Tabela 1, além da análise da digestibilidade "in vitro" da matéria seca.

Foram avaliados 10 materiais genéticos de sorgo, sendo 3 híbridos experimentais (CMSXS), 4 híbridos comerciais (BR); e como testemunha referencial foi usado o cultivar de milho BR 106 fornecidos pelo Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS-EMBRAPA), localizado em Sete Lagoas-MG. Outros 3 híbridos comerciais de sorgo de instituições privadas também foram avaliados (Tabela 1).

A escolha dos híbridos CMSXS e BR, à exceção do híbrido BR 600, baseou-se principalmente, no parentesco entre estes materiais visando fornecer informações adicionais ao programa de melhoramento genético de sorgo do CNPMS. Assim, os híbridos BR 300 e BR 304, que são híbridos comerciais da EMBRAPA, possuem o genitor masculino em comum com o híbrido CMSXS 375 que por sua vez possui o mesmo genitor feminino que o híbrido CMSXS 376. Os

híbridos CMSXS 356 e 359 possuem o genitor masculino em comum (CMSXS 180 R) e que apresenta dhurrin.

Tabela 1 - Relação de materiais genéticos avaliados. CNPMS - Sete Lagoas, MG. 1994.

Materiais Genéticos	Instituição de Origem
BR 300*	CNPMS-EMBRAPA
CMSXS 356*	CNPMS-EMBRAPA
BR 600	CNPMS-EMBRAPA
BR 304*	CNPMS-EMBRAPA
CMSXS 375	CNPMS-EMBRAPA
AG 3001	AGROCERES
A 9902	ASGROW
CMSXS 376	CNPMS-EMBRAPA
CS 111	ZENECA
CMSXS 359*	CNPMS-EMBRAPA
BR 106 (Milho)	CNPMS-EMBRAPA

* Materiais genéticos de sorgo SEM TANINO no grão.

Os híbridos comerciais de instituições privadas e o híbrido BR 600 foram incluídos neste estudo por possuírem tanino no grão e serem conhecidos comercialmente. A variedade de milho BR 106 foi utilizada neste estudo como testemunha.

As análises para a determinação da presença de taninos nas amostras foram realizadas no laboratório de Fisiologia Vegetal do CNPMS-EMBRAPA, utilizando os métodos Azul da Prússia (PRICE & BUTLER, 1977), Vanilina/HCl (PRICE et al., 1978) e Proantocianidina (HAGERMAN & BUTLER, 1981).

3.1.1. Extração dos taninos

Em tubos de ensaio contendo 500 mg do grão moído, foram adicionados 10 ml de HCl 1% em metanol. As amostras foram agitadas levemente por 20 minutos e a seguir centrifugadas por 8 minutos a 1000 rpm guardando o sobrenadante que se constituiu no extrato (PRICE et al., 1978).

3.1.2. Determinação do teor de tanino no grão

a) Método Azul da Prússia

Em erlemeyer de 125 ml foi adicionado 50 ml de água destilada e 0,2 ml do extrato. O controle foi constituído de 0,2 ml da solução de HCl 1% em metanol.

A seguir adicionou-se 3 ml de cloreto férrico (FeCl_3) 0,05M em HCl 0,1N. Após 3 minutos adicionou-se também 3 ml de ferrocianeto de potássio [$\text{FeK}_3 (\text{CN})_6$] 0,008M. A leitura de absorbância foi em espectrofotômetro a 720 nm. Para a determinação da presença de taninos nas amostras, utilizou-se uma curva padrão obtida a partir de soluções contendo diferentes concentrações de ácido tânico.

Curva padrão para determinação da presença de taninos pelo método Azul da Prússia

Em balão volumétrico de 100 ml adicionou-se 100 mg de ácido tânico completando-se o volume com uma solução de HCl 1% em metanol. Aliquotas de 0 a 1,0 ml com diferenças de 0,1 ml foram pipetadas em tubo de ensaio

completando-se o volume para 10 ml com a solução de HCl 1% em metanol.

A seguir, em erlemeyer contendo 50 ml de água bi-destilada, pipetou-se 0,1 ml da solução de 10 ml preparada anteriormente. Para o controle utilizou-se 0,1 ml da solução de HCl 1% em metanol. Foram adicionados 3 ml de cloreto férrico e após 3 minutos, 3 ml de ferrocianeto de potássio. A curva de absorbância vs concentração de ácido tânico foi obtida com leituras em espectrofotômetro a 720 nm e apresentada no APÊNDICE (Figura 1A) seguida de um exemplo numérico para o cálculo do teor de tanino nas amostras utilizando esta metodologia.

b) Método Vanilina/HCl

Inicialmente, preparou-se uma solução de HCl 8% em metanol e outra de vanilina 2% em metanol, sendo que estas duas soluções foram misturadas a seguir, obtendo-se assim uma solução de Vanilina/HCl. Para os tubos controle preparou-se um solução de HCl 4% em metanol.

Em cada tubo de ensaio, adicionou-se 1 ml do extrato (amostra) e 5 ml da solução de Vanilina/HCl com intervalos de um minuto. A leitura de absorbância em espectrofotômetro foi a 500 nm. Para a determinação da presença de tanino nas amostras, utilizou-se uma curva padrão obtida a partir de diferentes concentrações de catequina.

Curva padrão para a determinação da presença de taninos pelo método Vanilina/HCl

Em balão volumétrico de 200 ml adicionou-se 200 mg de catequina e completado o volume com metanol. Alíquotas de 5, 10, 25, 50 e 100 ml desta solução foram adicionadas em balão volumétrico de 100 ml completando-se o volume com metanol. Para a obtenção da curva padrão, o procedimento foi o mesmo para a determinação do teor de tanino nas amostras que foram substituídas por estas soluções. A Figura 2A do APÊNDICE mostra a curva padrão obtida e em seguida um exemplo dos cálculos para determinar o teor de tanino nas amostras por esta metodologia.

c) Método da proantocianidina

Em tubo de ensaio, adicionou-se 7 ml de uma solução de HCl 30% em álcool butílico e 0,5 ml do extrato (amostra). Para cada tubo controle adicionou-se 7 ml de uma solução contendo 15% de ácido acético 0,1 N , 15% de metanol e 70% de n-butanol além de 0,5 ml de cada amostra. Após 1 hora em temperatura ambiente, os tubos contendo estas soluções foram fervidos durante 60 minutos para a hidrólise. Quando os tubos esfriaram procedeu-se as leituras de absorbâncias em espectrofotômetro a 550 nm. Para a determinação da presença de taninos nas amostras, utilizou-se uma curva padrão obtida a partir de diferentes concentrações de tanino purificado de quebracho.

Curva padrão para determinação da presença de taninos pelo método da Proantocianidina

Em balão volumétrico de 100 ml adicionou-se 1 g de tanino purificado completando-se o volume com uma solução de HCl 1% em metanol. A partir desta solução, tomou-se alíquotas de 0 a 10ml com intervalos de 1 ml, completando-se o volume para 10 ml com solução de HCl 1% em metanol. Em tubos de ensaio, adicionou-se 7,0 ml da solução de HCl 30% em álcool butílico e 0,5 ml da solução de diferentes concentrações preparada anteriormente. Após 1 hora em temperatura ambiente, os tubos contendo estas soluções foram fervidos por 60 minutos e a seguir realizaram-se as leituras de absorbâncias em espectrofotômetro a 550 nm, construindo-se a curva de absorbância vs concentração de tanino. A Figura 3A do APÊNDICE mostra a curva padrão obtida seguida de um exemplo dos cálculos realizados para determinar o teor de tanino nas amostras utilizando esta metodologia.

3.1.3. Experimento com aves

O experimento foi conduzido em baterias no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (UFLA-Lavras/MG). Foram utilizados pintos da marca HUBBARD com 1 dia de idade, pesando 37 g em média. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com 4 repetições, sendo 2 repetições constituídas por parcelas contendo 23 pintos machos e 2 repetições constituídas por parcelas contendo 12 pintos fêmeas. O período experimental foi de 28 dias, determinando-se o ganho de peso, o consumo de

ração e a conversão alimentar aos 14 e 28 dias, que são considerados pontos críticos para se discriminar o desempenho das aves.

As rações foram constituídas dos materiais genéticos apresentados na Tabela 1 e possuíam baixo conteúdo de proteína (18%) com os mesmos níveis de aminoácidos essenciais como lisina (0,982%) e metionina/cistina (0,723%). A Tabela 2 mostra a composição das rações utilizada neste estudo, à base de milho ou sorgo para frangos de corte até 28 dias de idade.

Tabela 2 - Composição das rações (%) à base de milho ou sorgo utilizadas para frangos de corte até 28 dias de idade. Lavras, MG. 1994.

Alimentos	Sorgo	Milho
Milho/Sorgo	67,050	67,587
Farelo de Soja	29,310	28,800
Fosfato bicálcio	2,113	2,041
Calcário	0,815	0,875
Sal	0,370	0,370
DL-Metionina	0,118	0,103
Suplemento vitamínico	0,100	0,100
Suplemento Mineral	0,100	0,100
Bacitracina	0,025	0,025
TOTAL	100,000	100,000

3.1.4. Digestibilidade "in vitro" da matéria seca

A determinação da digestibilidade "in vitro" da matéria seca foi realizada no laboratório de nutrição

animal do Departamento de Zoologia da ESALQ/USP. A técnica utilizada foi descrita inicialmente por BAUGARDT et al. (1962) e modificada por TILLEY & TERRY (1963) com a adição de uma segunda etapa conforme o procedimento descrito a seguir:

1ª Etapa

Inicialmente pesou-se 0,5g da amostra moída em tubo de ensaio. A seguir adicionou-se em cada tubo 40 ml da saliva artificial (solução de McDougall) e 10 ml do líquido ruminal. Posteriormente, procedeu-se o borbulhamento das amostras com CO₂ por 10 segundos sendo os tubos arrolhados imediatamente com rolhas de borracha equipadas com válvula de Bunsen. As amostras foram incubadas por 48 horas a 39°C em estufa para fermentação. Utilizou-se, também, tubos controle que continham todas as soluções, porém, sem as amostras.

2ª Etapa

Terminada a primeira etapa, adicionou-se 6 ml de uma solução de HCl a 20% reduzindo o pH das soluções a valores menores que 2,0 a fim de cessar a atividade microbiana. A seguir os tubos foram centrifugados a 1.800 rpm, durante 15 minutos, descartando o sobrenadante.

Posteriormente, adicionou-se 10 ml de uma solução de pepsina a 5% em cada tubo que foram incubados, novamente, por mais 48 horas a 39°C, com agitações ocasionais. Em seguida, as amostras foram centrifugadas duas vezes a 1.800 rpm, durante 15 minutos, descartando-se

o líquido sobrenadante. Entre a primeira e a segunda centrifugação, o resíduo foi ressuspenso em água destilada. Após este procedimento os tubos foram levados à estufa a 105°C por 24 horas. As amostras foram pesadas obtendo assim a matéria seca residual após a digestão. A digestibilidade "in vitro" da matéria seca (DIVMS) foi determinada pela seguinte expressão:

$$\text{DIVMS} = 100 \times \frac{\text{g/M.S. amostra} - (\text{g/M.S. residual} - \text{g/M.S. do controle})}{\text{g/M.S. amostra}}$$

3.1.5. Análise eletroforética

Os dez cultivares de sorgo e o cultivar de milho foram submetidos a análise eletroforética das proteínas de reserva do endosperma em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) no laboratório de Genética Molecular do CNPMS-EMBRAPA.

O fracionamento das proteínas foi realizado de acordo com o método de LANDRY & MOREAUX (1970) com algumas modificações. Uma amostra de 50 mg do endosperma moído foi suspensa por 10 minutos em 500 μ l de uma solução 0,5M de NaCl sob agitação e submetida a uma centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos para a extração das albuminas e globulinas (Fração I). Para a extração das prolaminas, o precipitado da fração I foi lavado com água, centrifugado e suspenso em solução de álcool isopropílico 70% e 3% de 2-mercaptaetanol e centrifugado (fração II). Para a extração das glutelinas, o precipitado da fração II foi suspenso em uma solução de borato de sódio 0,0125 M, pH 10, 3% de 2-mercaptoetanol e 0,5% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e a seguir centrifugado (Fração III). A proporção 1:10 entre o

peso da amostra e o volume da solução extratora, tempo de incubação de 10 minutos com agitação e a centrifugação de 3000 rpm por 10 minutos, utilizados no preparo da fração I, foram mantidos no preparo das demais frações.

Para obtenção dos padrões eletroforéticos das proteínas presentes nas diferentes frações, foram misturados 30 μ l dos sobrenadantes com 30 μ l de uma solução tampão contendo 62,5 mM de tris-HCl pH 6,8, 2,3% de SDS, 5% de 2-mercaptaetanol e 5 μ l de uma solução 0,1% de azul de bromofenol e 10% de glicerol. A mistura foi aquecida em banho maria a 100°C por 5 minutos e 30 μ l foram aplicados no gel.

Os géis foram preparados com 5% de acrilamida, na região de formação de camadas ("Stacking gel") e 12,5% de acrilamida, na região de separação das proteínas ("Running gel"). A corrida foi desenvolvida a temperatura ambiente, aplicando-se uma corrente constante de 12 mA por uma hora, seguida de um período de três horas a 24 mA. Para a coloração das bandas protéicas, foi utilizada uma solução de coomassie azul brilhante R-250 a 0,1%, diluída em etanol/ácido acético/água (50:10:40 V/V) por 12 horas. Para lavagem do gel, foi utilizado metanol/ácido acético/água (5:10:85 V/V).

3.2. Experimento 2: Análise de cruzamentos dialélicos parciais para o teor de tanino em sorgo

3.2.1. Condução do experimento

Um experimento em esquema de cruzamentos dialélicos parciais (5 x 4) em sorgo, foi conduzido no

Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS-EMBRAPA) em Sete Lagoas/MG. Os materiais genéticos utilizados como parentais pertencem ao banco de germoplasma do CNPMS-EMBRAPA (Tabela 3). As linhagens CMSXS constituíram-se em parentais de alguns híbridos utilizados no experimento anterior. Definuiu-se como parentais do grupo 1 as linhagens com ausência de tanino e parentais do grupo 2 as linhagens com presença de tanino no grão.

Tabela 3 - Materiais genéticos avaliados em esquema de cruzamentos dialélicos parciais. CNPMS - Sete Lagoas, MG. 1994.

Linhagens	Parentesco ou Fonte Fornecedora da Linhagem
Grupo 1: sem tanino	
1. CMSXS 102B	Genitora feminina dos híbridos CMSXS 356 e BR 304.
2. CMSXS 116R	Genitora masculina do híbrido CMSXS 375.
3. CMSXS 180R	Genitora masculina dos híbridos CMSXS 356 e CMSXS 359.
4. ARK 1097	Arkansas (EUA).
5. IS 3981	Coleção Mundial de sorgo.
Grupo 2: com tanino	
1'. CMSXS 210B	Genitora feminina dos híbridos CMSXS 375 e CMSXS 376.
2'. SC 103-12	Coleção Mundial de Sorgo.
3'. RED HULL	Coleção Mundial de Sorgo.
4'. IS 1094 2B	Coleção Mundial de Sorgo.

Os vinte híbridos F_1 , incluindo os recíprocos e as nove linhagens foram avaliadas em um experimento no delineamento em blocos ao acaso com três repetições, sendo as parcelas constituídas de uma fileira de 5 metros.

Devido à quantidade de reagentes disponíveis no laboratório, além da simplicidade da metodologia utilizou-se para a determinação da presença de taninos nas amostras o método Azul da Prússia descrito por PRICE & BUTLER (1977).

3.2.2. Análise de variância

A representação esquemática da tabela dialética para análise de variância é apresentada na Tabela 4 de acordo com MIRANDA FILHO & GERALDI (1984).

Tabela 4 - Representação esquemática da tabela dialética (MIRANDA FILHO & GERALDI, 1984).

Y_{ij}	Grupo 2						Total ($Y_{i.}$)	Linhagens (1) : Y_{11}
	1'	2'	...	j	...	j		
Grupo 1	1	$Y_{11'}$	$Y_{12'}$		Y_{1j}	Y_{1j}	$Y_{1.}$	Y_{11}
	2	$Y_{21'}$	$Y_{22'}$		Y_{2j}	Y_{2j}	$Y_{2.}$	Y_{22}
	...						...	...
	i	$Y_{i1'}$	$Y_{i2'}$		Y_{ij}	Y_{ij}	$Y_{i.}$	Y_{i1}
	...						...	...
	I	$Y_{I1'}$	$Y_{I2'}$		Y_{Ij}	Y_{Ij}	$Y_{I.}$	Y_{I1}
Total ($Y_{.j}$)		$Y_{.1'}$	$Y_{.2'}$	...	$Y_{.j}$	...	$Y_{.j}$	$Y_{(1)}$
Linhagens (2) : Y_{j1}		$Y_{1'1'}$	$Y_{2'2'}$	...	Y_{j1}	...	Y_{j1}	Y_{11}

onde:

Y_{ij} : média do híbrido entre a linhagem i do grupo 1 (ausência de tanino) e a linhagem j do grupo 2 (presença de tanino).

$Y_{i.}$ e $Y_{.j}$: total dos híbridos em que participam as linhagens de ordem i e j , respectivamente.

Y_{ii} e Y_{jj} : são as médias das linhagens de ordem i e j , respectivamente.

$Y_{(1)}$ e $Y_{(2)}$: são os totais das linhagens dos grupos 1 e 2, respectivamente.

Y_H : total dos IJ híbridos entre os 2 grupos, isto é, $Y_H = Y_{..}$.

Y_T : é o total de todos os híbridos e linhagens ($Y_T = Y_{(1)} + Y_{(2)} + Y_H$).

O número total de linhagens e híbridos na tabela é: $N = I + J + IJ$.

A análise de variância (Tabela 5) foi conduzida considerando a média dos cruzamentos recíprocos de acordo com a metodologia descrita por GERALDI & MIRANDA FILHO (1988) desenvolvida a partir do método 2 do modelo de GRIFFING (1956), que permite verificar os efeitos dos parentais, dos híbridos e parentais vs híbridos. O efeito devido aos híbridos foi decomposto nos efeitos da capacidade geral de combinação (CGC) e capacidade específica de combinação (CEC). A média dos híbridos foi expressa conforme o seguinte modelo matemático:

$$Y_{ij} = m + g_i + g_j + s_{ij} + e_{ij}$$

onde:

m : média geral dos híbridos.

g_i e g_j : são os efeitos da capacidade geral de combinação da linhagem de ordem i e j , respectivamente.

s_{ij} : efeito da capacidade específica de combinação do híbrido Y_{ij} .

e_{ij} : erro experimental associado ao híbrido Y_{ij} .

As estimativas da capacidade geral de combinação (g) e capacidade específica de combinação (s_{ij}) foram obtidas pelas seguintes expressões:

$$g_i = Y_{i.} - Y_H$$

$$g_j = Y_{.j} - Y_H$$

$$s_{ij} = Y_{ij} - Y_{i.} - Y_{.j} + Y_H$$

onde:

$Y_{i.}$ e $Y_{.j}$: média dos cruzamentos em que participa cada um dos parentais de ordem i e j , respectivamente.

Y_H : média dos IJ cruzamentos entre os dois grupos de parentais.

Tabela 5 - Resumo da análise de variância para a percentagem de tanino em esquema de cruzamentos dialélicos parciais (GERALDI & MIRANDA FILHO, 1988).

FV	GL	QM	F
Blocos	2	QM ₁	QM ₁ /QM ₁₁
Populações	28	QM ₂	QM ₂ /QM ₁₁
Linhagens(1)	4	QM ₃	QM ₃ /QM ₁₁
Linhagens(2)	3	QM ₄	QM ₄ /QM ₁₁
Lin.(1) vs Lin.(2)	1	QM ₅	QM ₅ /QM ₁₁
Linhagens vs Híbridos	1	QM ₆	QM ₆ /QM ₁₁
Híbridos	19	QM ₇	QM ₇ /QM ₁₁
CGC(1)	4	QM ₈	QM ₈ /QM ₁₁
CGC(2)	3	QM ₉	QM ₉ /QM ₁₁
CEC	12	QM ₁₀	QM ₁₀ /QM ₁₁
Erro	56	QM ₁₁	QM ₁₁

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Experimento 1: Comparações entre métodos para determinar a presença de taninos em sorgo

Os padrões obtidos por eletroforese da fração I (albuminas e globulinas) e fração II (prolaminas) são apresentados nas Figuras 2 e 3, respectivamente. Nota-se que é possível discriminar os materiais genéticos de sorgo quanto à presença ou ausência de tanino no grão analisando os padrões eletroforéticos destes polipeptídeos. Observa-se que os materiais com tanino (números ímpares nas Figuras) apresentaram menor quantidade de proteína que os materiais sem tanino. Este resultado se deve à capacidade dos taninos de se associar e precipitar as proteínas (BUTLER, 1982a). Este fato ocorreu durante o procedimento de centrifugação após as amostras serem agitadas para a extração das proteínas.

Esta alteração no fracionamento das albuminas, globulinas e prolaminas devido à presença dos taninos estão de acordo com os resultados obtidos por JAMBUNATHAN & MERTZ (1973) e GUIRAGOSSIAN et al. (1978) que analisaram estas frações quantitativamente.

Quanto à fração III (glutelinas), os padrões eletroforéticos destes polipeptídeos não permitiram esta diferenciação entre os materiais com presença ou ausência

de tanino, provavelmente porque as proteínas desta fração não diferiram quanto a sua afinidade pelos taninos.

Figura 2 - Padrões de eletroforese das proteínas presentes na Fração I (albuminas e globulinas) extraídas de endosperma do sorgo ou milho. 1.BR 600; 2.BR 106(milho); 3.CMSXS 375; 4.BR 300; 5.AG 3001; 6.CMSXS 356; 7.A 9902; 8.BR 304; 9.CMSXS 376; 10.CMSXS 359; 11.CS 111.

Quanto aos métodos para determinar a presença de taninos em sorgo, a análise de variância apresentada na Tabela 6 mostra que houve diferenças significativas entre os materiais genéticos avaliados neste estudo. No entanto, o efeito de amostragem dentro de genótipos não foi significativo, ou seja, as quatro amostras retiradas de cada material para a análise do teor de tanino foram homogêneas. O efeito significativo para a fonte de

variação métodos mostra que as metodologias utilizadas neste estudo apresentaram resultados diferentes, este resultado se deve ao fato de que cada método é específico para determinados compostos (MAKKAR, 1989) .

Figura 3 - Padrões de eletroforese das proteínas presentes na Fração II (prolaminas) extraídas de endosperma do sorgo ou milho. 1.CS 111; 2.CMSXS 359; 3.CMSXS 376; 4.BR 304; 5.A 9902; 6.CMSXS 356; 7.AG 3001; 8.BR 300; 9.CMSXS 375; 10.BR 106 (milho); 11.BR 600.

resultados também mostraram interação significativa entre os materiais genéticos e os métodos de determinar a presença de taninos em sorgo, ou seja, alguns materiais apresentaram maior ou menor teor de tanino que outro, dependendo da metodologia utilizada. Este resultado é importante porque por uma metodologia pode-se detectar a

presença de taninos em um material (valores maiores que 0,8%) e por outra metodologia, os taninos estariam ausentes (valores menores que 0,8%). Assim, o produtor ao comercializar o sorgo, pode ter sua mercadoria desvalorizada ou rejeitada dependendo da metodologia utilizada para quantificar os compostos fenólicos.

Tabela 6 - Análise de variância para teor de tanino no grão (%) considerando os diferentes materiais genéticos avaliados e os três métodos de análise de tanino. Sete Lagoas, MG. 1994.

FV	GL	QM
Materiais Genéticos (G)	9	64,721**
Amostras dentro de Genótipos	30	0,087n.s.
Métodos (M)	2	98,836**
G X M	18	6,608**
Erro	60	0,123

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Os teores de tanino no grão utilizando os métodos Azul da Prússia, Vanilina/HCl e Proantocianidina para os materiais genéticos avaliados neste estudo são apresentados na Tabela 7. De um modo geral, o método da Proantocianidina apresentou valores maiores que o método Vanilina/HCl que por sua vez apresentou valores maiores que o método Azul da Prússia. Este resultado pode ser explicado devido ao fato de que cada método detecta diferentes compostos químicos. Resultados semelhantes foram obtidos por EARP et al. (1981) e BANDA-NYIRENDA et al. (1987) que também verificaram diferenças significativas no teor de tanino em sorgo, dependendo do método utilizado.

No entanto, deve-se considerar que os valores numéricos pouco acrescentam uma vez que, os materiais genéticos são classificados quanto a presença ou ausência de taninos.

A Tabela 7 mostra também que existe uma concordância entre os materiais genéticos quanto à presença ou ausência de tanino considerando os métodos Azul da Prússia e Vanilina/HCl. No entanto, quando se considera o método da Proantocianidina, isto não acontece, pois, os híbridos CMSXS 356 e CMSXS 359, por esta metodologia, apresentaram taninos e pelas metodologias Azul da Prússia e Vanilina/HCl os taninos estariam ausentes. Nota-se também que o híbrido BR 300 apresentou um valor muito próximo do limite que considera a presença de tanino (0,793) para o método da Proantocianidina, entretanto, para os dois outros métodos, este híbrido não apresentaria tanino. Provavelmente, estes resultados se devem à dificuldade de se utilizar substâncias adequadas para serem utilizadas como padrão para quantificar os taninos (HOSENEY et al., 1981; HAHN et al., 1984 e BUTLER, 1989b).

Como se observa na Tabela 7, o método Vanilina/HCl apresentou valores mais próximos ao método da Proantocianidina quando se considera os materiais genéticos com presença de tanino. Segundo PRICE et al. (1978), o método Vanilina/HCl possui tendência de superestimar o teor de tanino. Provavelmente, este resultado é devido a outros compostos que são detectados por estas metodologias e/ou substâncias que estas metodologias utilizam como padrão, catequina para o método Vanilina/HCl e tanino purificado para o método da Proantocianidina.

Tabela 7 - Teor de tanino em sorgo (%) determinado pelos métodos Azul da Prússia (AP), Vanilina/HCl (VA) e Proantocianidina (PRO). Média de quatro repetições. Sete Lagoas, MG. 1994.

Materiais Genéticos	Métodos		
	AP ¹	VA ²	PRO ³
BR 300**	0,257 b*	0,612 ab	0,793 a
CMSXS 356**	0,218 b	0,358 b	1,167 a
BR 600	2,185 b	7,085 a	7,210 a
BR 304**	0,513 a	0,133 a	0,128 a
CMSXS 375	2,895 c	8,285 a	6,750 b
AG 3001	1,863 c	5,700 b	7,647 a
A 9902	1,935 c	5,585 b	6,462 a
CMSXS 376	2,003 c	4,285 b	5,905 a
CS 111	1,565 c	4,737 b	5,660 a
CMSXS 359**	0,215 b	0,188 b	0,803 a

*Médias seguidas de mesma letra na linha horizontal não diferem pelo teste de DUNCAN a 5% de probabilidade.

**Materiais genéticos de sorgo sem tanino no grão.

1 - equivalente ácido tânico

2 - equivalente catequina

3 - tanino purificado

Estes resultados apresentados na Tabela 7, mostram a importância de se estabelecer uma metodologia adequada para detectar a presença de taninos por ocasião da comercialização do sorgo. Isto porque, para o produtor, seria mais interessante o método Azul da Prússia, por outro lado, para a indústria de moagem, os métodos Vanilina/HCl e Proantocianidina seriam mais adequados pois apresentam, de

um modo geral, valores mais altos e, por consequência, o menor preço pago ao produtor; além disso, como se observa, estas metodologias discriminam melhor os materiais, reduzindo assim a possibilidade de erro na classificação do sorgo quanto à presença ou ausência de tanino.

O ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar aos 14 e 28 dias obtidos durante a condução do experimento com aves e a digestibilidade "in vitro" da matéria seca dos diferentes materiais genéticos utilizados nas rações são apresentados na Tabela 8. Observa-se que as aves alimentadas com rações contendo sorgo sem tanino (BR 300, CMSXS 356, BR 304 e CMSXS 359) apresentaram maior ganho de peso, aos 14 e 28 dias que as aves alimentadas com rações à base de sorgo com tanino no grão. A média do ganho de peso das aves aos 14 dias foi de 268,00 g para sorgo sem tanino e 216,66 g para sorgo com tanino, o que representa uma redução de 19,2% no ganho de peso. Aos 28 dias a média de ganho de peso foi de 771,46 g para sorgo sem tanino e 571,76 g para sorgo com tanino, mostrando uma redução de 25,8% no ganho de peso devido à presença de taninos no grão. ELKIN & ROGLER (1991) também verificaram redução de 33% no ganho de peso de aves quando se comparou, na dieta, sorgo com tanino e sem tanino no grão. Quando se compara sorgo sem tanino com milho, observa-se que o ganho de peso aos 14 dias foi semelhante, no entanto, as aves alimentadas com rações à base de sorgo sem tanino apresentaram, em média, ganho de peso um pouco maior aos 28 dias que as aves alimentadas com rações contendo milho (Tabela 8). Segundo GUALTIERI & RAPACCINI (1990), os cultivares mais modernos de sorgo sem tanino, possuem valor nutritivo semelhante ao milho.

Tabela 8 - Médias do Ganho de Peso (GP), Consumo de Ração (CR), Conversão Alimentar (CA) aos 14 e 28 dias (g) por ave e a Digestibilidade "in vitro" da matéria seca (DIVMS) para cada material genético avaliado. Média de quatro repetições. Lavras, MG. 1994.

MATERIAIS GENÉTICOS	14 DIAS			28 DIAS			DIVMS (%)
	GP	CR	CA	GP	CR	CA	
BR 300*	270,02	464,43	1,72	791,62	1751,82	2,26	94,03
CMSXS 356*	268,56	503,02	1,88	753,64	1846,45	2,46	92,22
BR 600	202,34	427,48	2,12	496,10	1619,72	3,28	79,90
BR 304*	257,59	500,22	1,95	758,49	1869,62	2,47	91,04
CMSXS 375	188,38	504,64	2,68	457,76	1701,40	3,71	79,86
AG 3001	241,37	475,08	1,97	669,25	1839,85	2,75	83,64
A 9902	204,54	480,45	2,36	534,09	1695,34	3,21	84,57
CMSXS 376	237,03	489,59	2,08	666,44	1716,87	2,58	79,33
CS 111	226,32	491,63	2,18	606,92	1683,91	2,78	84,13
CMSXS 359*	275,84	471,96	1,70	782,10	1733,04	2,25	92,31
BR 106 (Milho)	277,23	444,19	1,61	732,92	1730,76	2,36	93,37

*Materiais genéticos de sorgo sem tanino no grão.

Observa-se também na Tabela 8, que as aves alimentadas com rações contendo os híbridos AG 3001 e CMSXS 376, apresentaram os maiores ganhos de peso entre os materiais genéticos com tanino, com valores próximos aos materiais genéticos sem tanino. Deve-se ressaltar que o híbrido CMSXS 376 possui o genitor feminino em comum com o híbrido CMSXS 375 que apresentou o menor desempenho com as aves. Assim, o genitor masculino do híbrido CMSXS 376 apresentou melhor combinação com a linhagem fêmea deste híbrido, sendo portanto, um material promissor na obtenção

de sorgo com tanino, resistente a pássaros e com boas qualidades nutritivas.

Quando se considera o consumo de ração aos 14 e 28 dias (Tabela 8), nota-se que os resultados obtidos para o milho e o sorgo foram semelhantes, entretanto, observou-se durante a condução do experimento que houve perda de ração nas parcelas contendo o híbrido CMSXS 375 que apresentou os maiores teores de tanino no grão considerando os métodos Azul da Prússia e Vanilina/HCl (Tabela 7). Esta perda se deve à rejeição, pelas aves, da ração que era lançada para fora do comedouro. Este fato contribuiu para superestimar o consumo de ração e, conseqüentemente, a conversão alimentar deste híbrido. Além disso, as aves que receberam ração à base deste sorgo, apresentaram também, hipertrofia da glândula parótida, confirmando a previsão de BUTLER et al. (1984).

A conversão alimentar foi melhor para os materiais genéticos sem tanino como pode ser observado na Tabela 8. Como não houve diferenças significativas no consumo de ração, este resultado se deve ao maior ganho de peso dos animais alimentados com ração contendo sorgo sem tanino, que apresentaram valores menores que 2,0 considerando a avaliação aos 14 dias. Observou-se um aumento da conversão alimentar aos 28 dias para todas as aves, que apresentaram valores maiores que 2,0, isto porque, houve um aumento considerável no ganho de peso, mas um consumo de ração ainda maior. Nota-se que os híbridos Br 600, A 9902 e CMSXS 375, que possuem tanino, apresentaram valores considerados altos, acima de 3,0, para a conversão alimentar. Estes resultados podem ser explicados pelo menor ganho de peso das aves alimentadas

com rações contendo estes materiais, embora tenha sido observada também, uma pequena redução no consumo de ração em relação aos demais materiais genéticos avaliados.

Esta superioridade das rações à base de milho ou sorgo sem tanino em relação à ração à base de sorgo com tanino, considerando o ganho de peso de aves e a conversão alimentar tem sido demonstrada por diversos autores (ROSTAGNO et al., 1973b; QUEIROZ et al., 1978 e BANDA-NYIRENDA et al., 1978).

A digestibilidade "in vitro" da matéria seca pode ser observada na Tabela 8. Nota-se que os materiais genéticos sem tanino apresentaram valores acima de 90%, valores comparáveis ao milho. Por outro lado, os materiais genéticos com tanino apresentaram valores menores que 85%. Segundo SHAFFERT et al. (1974), a diferença entre a digestibilidade do sorgo com tanino e sem tanino se deve à formação do complexo tanino-proteína. Observa-se que os híbridos CMSXS 376 e CMSXS 375, que possuem tanino, apresentaram os menores valores para a digestibilidade, 79,33% e 79,86%, respectivamente. No entanto, estes híbridos apresentaram desempenho diferente com as aves, mostrando assim que o híbrido CMSXS 376, apesar da presença de taninos no grão, possui qualidades nutritivas.

As correlações entre os teores de tanino determinados pelos diferentes métodos foram altas. Os dados obtidos pelo método Azul da Prússia apresentaram maior correlação com os resultados observados quando se utilizou o método Vanilina/HCl ($r = 0,96$) e menor correlação com os valores observados quando se utilizou o método da Proantocianidina ($r = 0,92$), este valor foi semelhante quando se comparou os teores de tanino obtidos

pelo método Vanilina/HCl e Proantocianidina ($r = 0,93$). Estes resultados mostram que os materiais genéticos avaliados neste estudo foram discriminados de forma semelhante pelos três métodos.

As correlações entre os teores de tanino analisados pelos diferentes métodos e os dados obtidos durante a condução do experimento com aves são apresentados na Tabela 9. Nota-se que as correlações entre os teores de tanino e o ganho de peso das aves foram altas e negativas, sendo que esta associação foi maior aos 28 dias. Percebe-se também que o teor de tanino determinado pelos métodos Azul da Prússia e Vanilina/HCl apresentaram maiores correlações com o ganho de peso das aves aos 28 dias ($r = -0,89$ e $r = -0,90$, respectivamente), do que o teor de tanino determinado pelo método da Proantocianidina ($r = -0,80$).

Observa-se na Tabela 9, que as correlações entre os teores de tanino e o consumo de ração aos 14 e 28 dias foram muito baixas, mostrando que o consumo de ração e o teor de tanino no grão, obtido pelos diferentes métodos não estão associados.

A Tabela 9 mostra também que as correlações entre os teores de tanino obtidos pelos três métodos e a conversão alimentar foram positivas e relativamente altas. Este resultado se deve às diferenças observadas no ganho de peso das aves uma vez que não houve diferenças significativas no consumo de ração quando se utilizou materiais genéticos com diferentes teores de tanino nas rações. De forma semelhante ao ganho de peso, as correlações entre a conversão alimentar e os teores de tanino obtidos pelos métodos Azul da Prússia e Vanilina/HCl

foram maiores que a correlação verificada entre a conversão alimentar quando se utilizou o método da Proantocianidina.

Tabela 9 - Correlações entre o teor de tanino em sorgo determinado pelos métodos Azul da Prússia (AP), Vanilina/HCl (VA), Proantocianidina (PRO) e o Ganho de Peso (GP), Consumo de Ração (CR), Conversão Alimentar (CA) aos 14 e 28 dias e a Digestibilidade "in vitro" da matéria seca (DIVMS). Lavras, MG. 1994.

Métodos	GP14	GP28	CR14	CR28	CA14	CA28	DIVMS
AP	-0,86	-0,89	-0,02	-0,11	0,70	0,66	-0,94
VA	-0,84	-0,90	-0,12	-0,21	0,64	0,60	-0,89
PRO	-0,75	-0,80	-0,10	-0,16	0,55	0,52	-0,91

As correlações entre os teores de tanino determinados pelos três métodos e a digestibilidade "in vitro" da matéria seca foi negativa e alta (Tabela 9). HARRIS et al. (1990) obteve resultado semelhante ($r = -0,90$) entre o teor de tanino determinado pelo método Vanilina/HCl e a digestibilidade. Como se observa, os teores de tanino obtidos pelo método Azul da Prússia apresentaram correlação um pouco maior com a digestibilidade do que os outros dois métodos.

Observando os resultados apresentados na Tabela 9, pode-se dizer que o teor de tanino determinado pelo método Azul da Prússia, apresentou, em geral, uma melhor correlação com a digestibilidade e também com os dados obtidos durante a condução do experimento com aves. Segundo HAGERMAN & BUTLER (1989), o método Azul da Prússia

é menos susceptível à interferência de proteínas. Entretanto, este método não discrimina compostos fenólicos que são taninos e aqueles que não são taninos ou entre fenóis e outros materiais facilmente oxidáveis como o ácido ascórbico. Contudo, este método utiliza reagentes que podem ser encontrados com relativa facilidade no comércio a um baixo custo como cloreto férrico e ferrocianeto de potássio, além do ácido tânico que pode ser utilizado satisfatoriamente como padrão. Desta forma, este método seria o mais recomendado, no entanto, os dois outros métodos, Vanilina/HCl e Proantocianidina também podem ser utilizados com sucesso para determinar a presença de taninos em sorgo.

4.2. Experimento 2: Análise de cruzamentos dialélicos parciais para teor de tanino em sorgo

O teor de tanino no grão variou entre 0,110% a 0,290% equivalente ácido tânico entre as linhagens do grupo 1 e entre 1,869% a 2,753% entre as linhagens do grupo 2. Os híbridos apresentaram valores entre 0,897% a 2,067%, conforme pode ser observado na Tabela 10. Esses resultados mostram uma ampla variabilidade para teor de tanino no grão.

Como se observa na Tabela 11, houve diferenças significativas entre as populações. Este efeito se deve principalmente às diferenças observadas entre as linhagens do grupo 1 e do grupo 2. Observa-se também que os parentais do grupo 1 mostraram-se homogêneos, diferentemente das linhagens do grupo 2. Nota-se que houve diferenças entre os parentais e os híbridos e também entre

as populações constituídas pelos híbridos, sendo que estas diferenças podem ser explicadas pelos efeitos significativos da capacidade geral de combinação (CGC) das linhagens do grupo 1 e grupo 2 e pela capacidade específica de combinação (CEC). O efeito significativo para a CGC mostra que os parentais contribuíram diferentemente para a média do teor de tanino nos híbridos. Nota-se que, apesar de não ter sido observado diferenças significativas entre as linhagens do grupo 1, estas contribuíram diferentemente para a média dos híbridos.

Tabela 10 - Teor de tanino (%) equivalente ácido tânico das linhagens e dos híbridos. Média de 3 repetições. Sete Lagoas, MG. 1994.

Linhagens cruzadas		Grupo 2: com tanino				Linhagens (1)
		1'	2'	3'	4'	
Grupo 1: sem tanino	1	1,044	1,028	1,979	1,419	0,245
	2	1,909	1,054	1,582	1,912	0,110
	3	1,417	0,897	1,982	1,703	0,290
	4	1,215	1,050	2,067	1,848	0,252
	5	1,066	0,958	1,301	0,999	0,182
Linhagens (2)		2,143	1,869	2,753	2,619	

O efeito significativo da CEC mostra que os híbridos avaliados neste estudo, apresentaram em geral, desempenho diferente em relação ao esperado com base no comportamento médio dos parentais envolvidos. Observa-se também que o quadrado médio (QM) devido a CGC foi maior que o QM devido a CEC, evidenciando uma maior contribuição dos

efeitos aditivos controlando o teor de tanino no grão (Tabela 11).

Tabela 11 - Análise de variância da tabela dialélica para teor de tanino no grão. Sete Lagoas, MG. 1994.

FV	GL	QM
Populações	28	0,5092**
Linhagens (1)	4	0,0049
Linhagens (2)	3	0,1693**
Linh. (1) vs Linh. (2)	1	10,0830**
Linh. vs Híbridos	1	0,4162**
Híbridos	19	0,1698**
CGC (1)	4	0,1772**
CGC (2)	3	0,5703**
CEC	12	0,0673**
Erro	56	0,0050

As estimativas da capacidade geral de combinação (g_i e g_j) e capacidade específica de combinação (s_{ij}) são apresentadas na Tabela 12. Observa-se que as linhagens CMSXS 116R (2) e RED HULL (3') apresentaram as maiores estimativas para a CGC, 0,1927 e 0,3607 respectivamente, isto mostra que estas linhagens podem ser utilizadas como parentais em programas de melhoramento se o objetivo do melhorista for a presença de tanino no grão. Por outro lado, as linhagens IS 3981 (5) e SC 103-12 (2') apresentaram as menores estimativas para a capacidade geral de combinação (CGC), -0,3405 e -0,4241 respectivamente, portanto, estes materiais genéticos podem ser utilizados em

programas de melhoramento se o objetivo do melhorista for a ausência de tanino no grão.

Quanto à capacidade específica de combinação, o híbrido CMSXS 116R (2) X RED HULL (3') apresentou a menor estimativa (-0,3929). Isto mostra que estes materiais genéticos, quando em cruzamentos para a formação de híbridos, contribuem com maior número de alelos para ausência do teor de tanino no grão. Por outro lado, os híbridos CMSXS 116R (2) X CMSXS 210B (1') e IS 3981 (5) X SC 103-12 (2') apresentaram as maiores estimativas da CEC; 0,3861 e 0,3011 respectivamente, mostrando que estes materiais genéticos se complementam com alelos favoráveis para presença de tanino no grão (Tabela 12).

Tabela 12 - Estimativas da capacidade geral de combinação (g_i e g_j) e capacidade específica de combinação (s_{ij}) para teor de tanino no grão. Sete Lagoas, MG. 1994.

S _{ij}		Grupo 2: com tanino				g _i
		1'	2'	3'	4'	
Grupo 1: sem tanino	1	-0,2322	0,0846	0,2508	-0,1032	-0,0540
	2	0,3861	-0,1361	-0,3929	0,1431	0,1927
	3	0,0086	-0,1786	0,1216	0,0486	0,0782
	4	-0,2387	-0,0709	0,1613	0,1483	0,1235
	5	0,0763	0,3011	-0,1407	-0,2367	-0,3405
g _j		-0,0913	-0,4241	0,3607	0,1547	

Nota-se que apesar das linhagens CMSXS 116R (2) e RED HULL (3') apresentarem as maiores estimativas para a CGC, o híbrido entre estas linhagens apresentou a

menor estimativa para a CEC (Tabela 12). De forma semelhante, as linhagens IS 3981 (5) e SC 103-12 (2') apresentaram as menores estimativas para a CGC, no entanto, o híbrido entre estas linhagens apresentou estimativa relativamente alta para a CEC. Provavelmente, estes resultados se devem a epistasia duplo recessiva envolvendo os genes B_1 e B_2 que controlam a pigmentação da testa.

5. CONCLUSÕES

a) O teor de tanino determinado para cada material genético foi diferente conforme a metodologia utilizada.

b) Para detectar a presença de compostos fenólicos em sorgo, recomenda-se o método Azul da Prússia que dentre os métodos avaliados neste estudo foi o que apresentou maior correlação com os dados de resposta biológica.

c) Padrões eletroforéticos das albuminas, globulinas e prolaminas permitiram também diferenciar cultivares de sorgo quanto a presença de tanino.

d) Os materiais genéticos avaliados neste estudo apresentaram ampla variabilidade para o teor de tanino no grão.

e) As linhagens diferiram quanto à capacidade de combinação para aumentar ou reduzir o teor de tanino no grão.

f) O teor de tanino mostrou ser uma característica controlada por genes com predominância de efeitos aditivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.O.A.C. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS.
Official methods of analysis. 9.ed. Washington: 1960.
p.111.
- BANDA-NYIRENDA, D.B.G.; VOHRA, P.; INGEBRETSON, K.H.
Nutritional evaluation of some varieties of sorghum
[*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. **Cereal Chemistry**, v.64,
n.6, p.413-7, nov./dec. 1987.
- BATE-SMITH, E.C. Haemanalysis of tannins: the concept of
relative astringency. **Phytochemistry**, v.12, p.907-12,
1973.
- BAUMGARDT, B.R.; TAYLOR, M.W.; CASON, J.L. Evaluations of
forages in the laboratory. II. Simplified rumen
procedure for obtaining repeatable estimates of forage
nutritive value. **Journal Dairy Science**, v.45, n.1, p.62-
8, 1962.
- BOORA, K.S.; LODHI, G.P. Combining ability for toxic
constituents in forage sorghum. **Indian Journal of
Agricultural Science**, v.52, p.211-4, 1982.

- BORGES, J.F.M. Avaliação do teor de tanino em linhagens de sorgo granífero [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] e seus cruzamentos. Piracicaba, 1993. 91p. Dissertação(M.S.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", Universidade de São Paulo.
- BULLARD, R.W.; YORK, J.O.; KILBURN, S.R. Polyphenolic changes in ripening bird-resistant sorghums. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.29, p.973-81, 1981.
- BURNS, R.E. Method for estimation of tannin in grain sorghum. **Agronomy Journal**, v.63, p.511-2, may/jun. 1971.
- BUTLER, L.G. Polyphenols and their effects on sorghum quality. IN: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SORGHUM GRAIN QUALITY, Patancheru, 1981. **Proceedings**. Patancheru, India, ICRISAT, 1982a. p.294-311.
- BUTLER, L.G. Relative degree of polymerization of sorghum tannin during seed development and maturation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.30, p.1090-4, 1982b.
- BUTLER, L.G. New perspectives on the antinutritional effects of tannins. In: KINSELLA, J.E.; SOUCIE, B., ed. **Foods products**. Champaign: American Oil Chemistry Society, 1989a. Cap.22, p.402-9.
- BUTLER, L.G. Sorghum polyphenols. IN: CHEEKE, P.R., ed. **Toxicants of plant origin**. Boca Raton: CRC Press, 1989b. v.4, cap.5, p.95-121.

- BUTLER, L.G. Sorghum polyphenols: Assays and nutritional significance. IN: BIENNIAL GRAIN SORGHUM RESEARCH UTILIZATION CONFERENCE, Lubbock, 1989. **Proceedings.** Lubbock, 1989c. p.39-42.
- BUTLER, L.G. Tannins and other phenols: effects on sorghum production utilizations. **Intsormil Annual Report**, p.153-6. 1989d.
- BUTLER, L.G.; ROGLER, J. Enhancement of high tannin sorghum utilization: characterization, metabolism, and detoxification of sorghum tannins and other polyphenols. IN: WINN, J.F., ed. **Intsormil fighting hunger with research.** Lincoln, p.140-5, 1985.
- BUTLER, L.G.; PRICE, M.P.; BROTHERTON, J.E. Vanillin assay for proanthocyanidins (Condensed tannins): modification of the solvent for estimation of the degree of polymerization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v.30, p.1090-4, 1982.
- BUTLER, L.G.; RIEDL, D.J.; LEBRYK, D.G.; BLYTT, H.J. Interaction of proteins with sorghum tannin: mechanism, specificity and significance. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.61, n.5, p.916-20, may, 1984.
- CHIBBER, B.A.K.; MERTZ, E.T.; AXTELL, J.D. Effects of dehulling on tannin content, protein distribution, and quality of high and low tannin sorghum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.26, n.3, p.679-83, 1978.

- DANGI, O.P.; LUTHRA, Y.P. Breeding of sorghum for low tannin and high fodder yield. **Sorghum Newsletter**, v.21, p.29-30, 1978.
- DAVIS, A.B.; HOSENEY, R.C. Grain sorghum condensed tannins. II. Preharvest changes. **Cereal Chemistry**, v.56, n.4, p.314-6, 1979.
- EARP, C.F.; AKINGBALA, J.O.; RING, S.H.; ROONEY, L.W. Evaluation of several methods to determine tannins in sorghum with varying kernel characteristics. **Cereal Chemistry**, v.58, n.3, p.234-8, may/jun. 1981.
- EARP, C.F.; DOHERTY, C.A.; ROONEY, L.W. Fluorescence microscopy of the pericarp, aleurone layer and endosperm cell walls of these sorghum cultivars. **Cereal Chemistry**, v.60, n.5, p.408-10, sep./oct. 1983.
- ELKIN, R.G.; ROGLER, J.C. Differential response of ducks and chicks to dietary sorghum tannins. **Journal of Science and Food Agricultural**, v.57, p.543-53, 1991.
- GERALDI, I.O.; MIRANDA FILHO, J.B. Adapted models for the analysis of combining ability of varieties in partial diallel crosses. **Revista Brasileira de Genética**, v.11, n.2, p.419-30, 1988.
- GLENNIE, C.W. Polyphenol changes in sorghum grain during malting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V.31, p.1295-9, 1983.

GLENNIE, C.W.; KALUZA, W.A; NIEKERK, P.J.V. High performance liquid chromatography of procyanidins in developing sorghum grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.29, p.965-8, 1981.

GRIFFING, B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. **Australian Journal Biological Science**, v.9, n.4, p.463-93, 1956.

GUALTIERI, M.; RAPACCINI, S. Sorghum grain in poultry feeding. **World's Poultry Science Journal**, v.46, p.246-54, nov. 1990.

GUIRAGOSSIAN, V.; CHIBBER, B.A.K.; SCOYOC, S.V.; JAMBUNATHAN, R.; MERTZ, E.T.; AXTELL, J.D. Characteristics of proteins from normal, high lysine, and high tannin sorghum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.26, n.1, p.219-23, 1978.

HAGERMAN, A.E.; BUTLER, L.G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.26, p.809-12, 1978.

HAGERMAN, A.E.; BUTLER, L.G. Determination of protein in tannin-protein precipitates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.28, n.5, p.944-7, sep./oct. 1980a.

- HAGERMAN, A.E.; BUTLER, L.G. Condensed tannin purification and characterization of tannin associated proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.28, p.947-52, sep./oct. 1980b.
- HAGERMAN, A.E.; BUTLER, L.G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. **The Journal of Biological Chemistry**, v.256, n.9, p.4494-7, 1981.
- HAGERMAN, A.E.; BUTLER, L.G. Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. **Journal of Chemical Ecology**, v.15, n.6, p.1795-810, 1989.
- HAHN, D.H.; ROONEY, L.W. Effect of genotype on tannins and phenols of sorghum. **Cereal Chemistry**, v.63, n.1, p.4-8, 1986.
- HAHN, D.H.; FAUBION, J.M.; ROONEY, L.W. Sorghum phenolic acids, their high performance liquid chromatography separation and their relation to fungal resistance. **Cereal Chemistry**, v.60, n.4, p.255-9, 1983.
- HAHN, D.H.; ROONEY, L.W.; EARP, C.F. Tannins and phenols of sorghum. **Cereal Foods World**, v.29, n.12, p.776-9, dec. 1984.
- HARRIS, H.B.; BURNS, R.E. Influence of tannin content on preharvest seed germination in sorghum. **Agronomy Journal**, v.62, p.835-6, nov./dec. 1970.

- HARRIS, H.B.; BURNS, R.E. Relationship between tannin content of sorghum grain and preharvest seed molding. **Agronomy Journal**, v.65, p.957-9, nov./dec. 1973.
- HARRIS, H.B.; CUMMINS, D.G.; BURNS, R.E. Tannin content and digestibility of sorghum grain as influenced by bagging. **Agronomy Journal**, v.62, p.633-5, sep./oct. 1970.
- HOSENEY, R.C.; VARRIANO-MARSTON, E.; DENDY, D.A.V. Sorghum and millets. **Advances in Cereal Science and Technology**, v.4, p.71-144, 1981.
- JAMBUNATHAN, R.; MERTZ, E. Relationship between tannin levels, rat growth, and distribution of proteins in sorghum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.21, n.4, p.692-696, 1973.
- JAMBUNATHAN, R.; BUTLER, L.G.; BANDYOPADLIYAY, R.; MUGHOGHO, L.K. Polyphenol concentrations in grain, leaf, and callus tissues of mold-susceptible and mold-resistant sorghum cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.34, n.3, p.425-29, 1986.
- KAAN, F.; BOYAT, A. Preliminary results about sorghum seed tannin inheritance. **Sorghum Newsletter**, v.27, p.103, 1984.

LANDRY, J.; MOUREAUX, T. Heterogeneity of the glutelins of the grain of corn, selective extraction and composition in amino acids of the insoluble fractions. **Bulletin de la Société Chimie Biologique**, v.52, p.1021-37, 1970.

MAKKAR, H.P.S. Protein precipitation methods for quantitation of tannins: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.37, n.4, p.1197-202, 1989.

MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Behaviour of tannic acid from various commercial sources towards redox, metal complexing and protein precipitation assays of tannins. **Journal of Science and Food Agricultural**, v.62, p.295-299, 1993.

MAXON, E.D.; ROONEY, L.W. Evaluation of methods for tannin analysis in sorghum grain. **Cereal Chemistry**, v.49, n.6, p.719-29, nov./dec. 1972.

McMILLIAN, W.W.; WISEMAN, B.R.; BURNS, R.E.; HARRIS, H.B.; GREENE, G.L. Bird resistance in diverse germplasm of sorghum. **Agronomy Journal**, v.64, p.821-2, nov./dec. 1972.

MIRANDA FILHO, J.B.; GERALDI, I.O. An adapted model for the analysis of partial diallel crosses. **Revista Brasileira de Genética**, v.7, n.4, p.677-88, dec. 1984.

- MONTGOMERY, C.R.; NELSON, B.D.; JOOST, R.; MASON, L.F.
Tannin concentration and quality changes in sorghum as
affected by maturity and sorghum type. **Crop Science**,
v.26, p.372-5, mar./apr. 1986.
- MWASARV, M.A.; REICHERT, R.D.; MUKURU, S.Z. Factors
affecting the abrasive dehulling efficiency of high
tannin sorghum. **Cereal Chemistry**, v.65, n.3, p.171-4,
1988.
- OH, H. IL; HOFF, J.E.; ARMSTRONG, G.S.; HAFF, L.A.
Hydrophobic interaction in tannin-protein complexes.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.28, n.2,
p.394-8, 1980.
- PRATES, H.T.; BUTLER, L.; SCHAFFERT, R.; SANTOS, F.G.;
RODRIGUES, J.A.S.; RASLAN, D.S. Extração, isolamento e
caracterização de dhurrin em sorgo sem tanino resistente
a pássaro. In: XXI CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO.
Trabalhos apresentados. Londrina, PR, jul. 1996. p.261.
- PRICE, M.L.; BUTLER, L.G. Rapid visual estimation and
spectrophotometric determination of tannin content of
sorghum grain. **Journal of Agricultural and Food
Chemistry**, v.25, n.6, p.1268-73, 1977.
- PRICE, M.L.; SCOYOC, A.V.; BUTLER, L.G. A critical
evaluation of the vanillin reaction as an assay for
tannin in sorghum grain. **Journal of Agricultural and
Food Chemistry**, v.26, n.5, p.1214-8, 1978.

PRICE, M.L.; STROMBERG, A.M.; BUTLER, L.G. Tannin content as a function of grain maturity and drying conditions in several varieties of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.27, p.1270-4, 1979.

QUEIROZ, A.C.; ROSTAGNO, H.S.; SILVA, M.A.; FONSECA, J.B. Sorgo com diferentes conteúdos de tanino como substitutos do milho para aves. **Revista Ceres**, v.25, n.139, p.234-41, 1978.

RELATÓRIO TÉCNICO ANUAL DO CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE MILHO E SORGO 1992 - 1993. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, p.342, 1994.

RODRIGUES, W.A. Variabilidade para teor de tanino em sorgo (*Sorghum bicolor* L.), seu controle genético e associação com a resistência à pássaros. Lavras, 1991. 72p. Dissertação (M.S.) - Universidade Federal de Lavras.

RODRIGUES, W.A.; PAIVA, E.; SANTOS, F.G.; RODRIGUES, J.A.S. Variabilidade para teor de tanino em sorgo (*Sorghum bicolor* L.) e sua associação com a resistência a pássaros. **Ciência e Prática**, v.16, n.1, p.74-7, jan./mar. 1992.

ROONEY, L.W.; SULLINS, R.D. The structure of sorghum and its relation to processing and nutritional value. In: SYMPOSIUM OF THE INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR CEREAL CHEMISTRY, Viena, 1976. **Trabalhos apresentados**. Viena, IACC, 1976. p.91-109.

ROSTAGNO, H.S.; FEATHERSTON, W.R.; ROGLER, J.C. Studies on the nutritional value of sorghum grains with varying tannin contents for chicks. 2. Amino acid digestibility studies. **Poultry Science**, v.52, p.772-8, 1973a.

ROSTAGNO, H.S.; FEATHERSTON, W.R.; ROGLER, J.C. Studies on the nutritional value of sorghum grains with varying tannin contents for chicks. 1. Growth studies. **Poultry Science**, v.52, p.765-72, 1973b.

SCHAFFERT, R.E.; LECHTENBERG, V.L.; WHYKERD, C.L. Effect of tannin on "in vitro" dry matter and protein disappearance in sorghum grain. **Crop Science**, v.14, p.640-3, sept./oct. 1974.

SCHAFFERT, R.E.; PRATES, H.T.; BUTLER, L.; SANTOS, F.G.; RODRIGUES, J.A.S. Sorgo sem tanino resistente a pássaro. In: XXI CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO. **Trabalhos apresentados**. Londrina, PR, jul. 1996. p.262.

SPENCER, C.M.; CAI, Y.; MARTIN, R.; GAFFNEY, S.H.; GOLDINE, P.N.; MAGNOLATO, D.; LILLEY, T.H.; HASLAM, E. Polyphenol complexation-some thoughts and observations. **Phytochemistry**, v.27, n.8, p.2397-409, 1988.

SUBRAMANIAN, V.; BUTLER, L.G.; JAMBUNATHAN, R.; PRASADA RAO, K.E. Some agronomic and biochemical characters of brown sorghum and their possible role bird resistance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.31, n.6, p.1303-7, 1983.

- TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the "in vitro" digestion of forage crops. **J. Brit. Grassl. Soc.**, v.18, n.2, p.104-11, 1963.
- TIPTON, K.W.; FLOYD, E.H.; MARSHALL, J.G.; McDEVITT, J.B. Resistance of certain grain sorghum hibrids to bird damage in Lousiana. **Agronomy Journal**, v.62, p.211-3, mar./apr. 1970.
- WATTERSON, J.B.; BUTLER, L.G. Ocurrence of an unusual lencoanthocyanidin and absence of proanthocyanidins in sorghum leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.31, n.1, p.41-5, 1983.
- WOODRUFF, B.J.; CANTRELL, R.P.; AXTELL, J.D.; BUTLER, L.G. Inheritance of tannin quantity of sorghum. **The Journal Heredity**, v.73, n.3, p.214-8, may/jun. 1982.

APÊNDICE

Figura 1A - Curva padrão de ácido tânico utilizada para o método Azul da Prússia (PRICE & BUTLER, 1977).

Exemplo de cálculo da percentagem de fenóis totais através do método Azul da Prússia (PRICE & BUTLER, 1977).

Leitura de absorbância da amostra: 0,428

A partir da equação de regressão da curva padrão tem-se:

$$X = \frac{0,428 - 0,0103}{0,6201} = 0,6736 \text{ mg/ml ac. tânico}$$

0,6736 mg ----→ 1 ml

Z ←---- 10 ml

Z = 6,736 mg/10 ml

6,736 mg ----→ 500 mg

W ←---- 100 mg

W = 1,34% fenóis totais.

Figura 2A - Curva padrão de catequina utilizada para o método Vanilina/HCl (PRICE et al., 1978).

Exemplo de cálculo para a determinação de catequina equivalente (C.E.) pelo método Vanilina/HCl (PRICE et al., 1978).

Utilizou-se a seguinte expressão:

$$C.E. = \frac{5 \times d.o.}{I}$$

onde:

C.E.: equivalente catequina

d.o.: leitura de absorbância a 500 nm da amostra

I: inclinação da curva padrão

Leitura de absorbância da amostra: 0,525 nm
então:

$$C.E. = \frac{5 \times 0,525}{0,692} = 3,79 \text{ mg/ml de catequina}$$

$$3,79 \text{ ----} \rightarrow 1 \text{ ml}$$

$$Z \leftarrow \text{----} 10 \text{ ml}$$

$$Z = 37,9 \text{ mg/10 ml}$$

$$37,9 \text{ mg ----} \rightarrow 500 \text{ mg}$$

$$W \leftarrow \text{----} 100 \text{ mg}$$

$$W = 7,58\% \text{ C.E.}$$

Figura 3A - Curva padrão de tanino purificado utilizada para o método da Proantocianidina (HAGERMAN & BUTLER, 1981).

Exemplo de cálculo para a determinação da percentagem de tanino pelo método da proantocianidina (HAGERMAN & BUTLER, 1981).

Leitura de absorbância da amostra: 0,410

A partir da equação de regressão da curva padrão tem-se:

$$X = \frac{0,410 - 0,1053}{0,07921} = 3,846 \text{ mg/ml de tanino purificado}$$

$$3,846 \text{ mg} \text{ ----} \rightarrow 1 \text{ ml}$$

$$Z \quad \leftarrow \text{----} 10 \text{ ml}$$

$$Z = 38,46 \text{ mg/10 ml}$$

$$38,46 \text{ mg} \text{ ----} \rightarrow 500 \text{ mg}$$

$$W \quad \leftarrow \text{----} 100 \text{ mg}$$

$$W = 7,69\% \text{ tanino}$$